



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Prevalência molecular e serológica de *Coxiella burnetii* em explorações de bovinos leiteiros em Rio Mau, Vila do Conde

Miguel Bastos Martins Nunes Silva

Orientador(es) | Elisa Maria Bettencourt
Luís Miguel Lourenço Martins
Andreia Gonçalves dos Santos

Évora 2025





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Prevalência molecular e serológica de *Coxiella burnetii* em explorações de bovinos leiteiros em Rio Mau, Vila do Conde

Miguel Bastos Martins Nunes Silva

Orientador(es) | Elisa Maria Bettencourt
Luís Miguel Lourenço Martins
Andreia Gonçalves dos Santos

Évora 2025





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Ricardo Jorge Romão (Universidade de Évora)

Vogais | Elisa Maria Bettencourt (Universidade de Évora) (Orientador)
José Maria Cardoso () (Arguente)

Prevalência molecular e serológica de *Coxiella burnetii* em explorações de bovinos leiteiros em Rio Mau, Vila do Conde

Resumo

A *Coxiella burnetii* é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória, responsável pela febre Q nos humanos e coxielose nos animais. A febre Q é uma doença zoonótica de distribuição mundial caracterizada pelo seu pleomorfismo clínico, sendo que nos ruminantes as manifestações da coxielose ocorrem maioritariamente a nível reprodutivo.

De forma a avaliar a prevalência molecular e serológica de *Coxiella burnetii*, foram recolhidas amostras de leite do tanque (BTM) de 25 explorações de bovinos leiteiros na região de Rio Mau, Vila do Conde, e submetidas a testes de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Adicionalmente, foi efetuado um inquérito a cada produtor relacionado com as condições das explorações e saúde dos efetivos.

Das 25 explorações, 14 (56,0%) foram positivas para o PCR e 17 (68,0%) para o ELISA. Após análise da relação entre os fatores avaliados nos inquéritos e a positividade dos testes, não se verificaram associações estatisticamente significativas.

PALAVRAS-CHAVE: Prevalência; *Coxiella burnetii*; Bovinos leiteiros; BTM; Rio Mau

Molecular and serological prevalence of *Coxiella burnetii* in dairy cattle farms from Rio Mau, Vila do Conde

Abstract

Coxiella burnetii is an obligate intracellular gram-negative bacterium, responsible for Q fever in humans and coxiellosis in animals. Q fever is a worldwide zoonotic disease with a pleomorphic clinical presentation in humans, while coxiellosis is mostly associated with reproductive disorders in ruminants.

To assess the molecular and serological prevalence of *Coxiella burnetii*, Bulk tank milk (BTM) samples were collected from 25 dairy cattle farms in Rio Mau region, Vila do Conde, and submitted to *Polymerase Chain Reaction* (PCR) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testing. Additionally, a survey was conducted regarding the biosecurity measures implemented in said farms and the health of the herds.

Out of 25 farms, 14 (56,0%) tested positive for PCR and 17 (68,0%) for ELISA. Regarding the survey, no statistically significant associations were found between the individual factors evaluated and the positivity of the tests.

KEYWORDS: Prevalence; *Coxiella burnetii*; Dairy cattle; BTM; Rio Mau

Índice

Resumo.....	I
Abstract	II
Índice.....	III
Índice de imagens.....	V
Índice de tabelas	VI
Índice de gráficos	VIII
I. Revisão bibliográfica.....	1
1 Introdução: Uma abordagem histórica à febre Q	1
1.1 Brisbane, Queensland	1
1.2 Hamilton, Montana	2
1.3 A ponte entre Austrália e Estados Unidos da América	3
1.4 Nomenclatura	3
1.5 Importância da febre Q na atualidade	4
2 Caracterização do agente etiológico	5
2.1 Taxonomia	5
2.2 Morfologia	5
2.3 Variação antigénica	7
2.4 Células suscetíveis e ciclo de vida	8
3 Epidemiologia	11
3.1 Reservatórios	11
3.2 Vias de transmissão	16
3.2.1 Via aerógena.....	16
3.2.2 Via oral	17
3.2.3 Via transcutânea	18
3.2.4 Via sexual.....	18
3.2.5 Transmissão inter-humana	19
3.3 Fatores de risco	20
3.4 Prevalência	22
3.4.1 Em humanos.....	22

3.4.2	Nos ruminantes domésticos	26
4	Sinais clínicos da infeção	32
4.1	Em humanos	32
4.1.1	Febre Q aguda	33
4.1.2	Febre Q crónica vs Complicações a longo prazo	35
4.1.3	Febre Q em mulheres grávidas.....	37
4.2	Nos ruminantes domésticos	38
4.2.1	Bovinos	39
4.2.2	Pequenos ruminantes.....	40
5	Diagnósticos diferenciais	41
6	Métodos de diagnóstico.....	42
6.1	Métodos Diretos	43
6.2	Métodos Indiretos	45
7	Controlo e prevenção	46
7.1	Terapêutica.....	47
7.2	Vacinação	48
II.	Estudo Experimental	50
8	Prevalência molecular e serológica de <i>Coxiella burnetii</i> em explorações de bovinos leiteiros em Rio Mau, Vila do Conde	50
8.1	Objetivos.....	50
8.2	Material e métodos	50
8.2.1	Caracterização da área em estudo e seleção do número de explorações ..	50
8.2.2	Recolha das amostras de BTM	50
8.2.3	Inquérito aos produtores.....	51
8.2.4	Testes estatísticos	51
8.2.5	Testes laboratoriais	51
8.3	Resultados.....	56
8.3.1	Dados obtidos nos inquéritos	56
8.3.2	Resultado dos testes de PCR e ELISA.....	63
8.3.3	Relação dos indicadores da exploração com os testes laboratoriais	65
8.4	Discussão	72
8.5	Conclusão.....	77
9	Anexos	78
10	Referências bibliográficas	81

Índice de imagens

Figura 1 - Incidência anual de febre Q aguda por município e localização das explorações infetadas, no período de 2007 a 2010, nos Países Baixos. BTM: leite de tanque (Adaptado de ¹⁵)	4
Figura 2 - Árvore filogenética representativa das relações de <i>C. burnetii</i> com outras espécies pertencentes ao filo Proteobacteria, obtida através de sequenciação de genes (16S rRNA) ¹	5
Figura 3 - Estrutura da parede celular de <i>Coxiella burnetii</i> . (Adaptado de ²¹)	6
Figura 4 - Visualização das três variantes de <i>C. burnetii</i> por microscopia eletrónica. (A) SCV purificadas, sendo possível observar a característica cromatina condensada. (B) LCV purificadas, observando-se a cromatina dispersa pelo citoplasma. (C) LCV purificadas com presença de partículas semelhantes a endósporos, SDC (setas pretas), num dos seus polos. Escala = 2 µm. ²⁶	7
Figura 5 - Vacúolo parasitóforo de <i>Coxiella burnetii</i> . (A) Observação de vários vacúolos parasitóforos (setas brancas) por microscopia de contraste de fase numa célula Vero infetada, quatro dias pós infeção. (B) Observação de um vacúolo parasitóforo de grandes dimensões por microscopia eletrónica de transmissão numa célula Vero infetada, quatro dias pós infeção. O núcleo da célula hospedeira (N) encontra-se empurrado para a periferia da célula pelo VP. ³⁹ ...	9
Figura 6 - Ciclo de vida de <i>Coxiella burnetii</i> . Uma célula hospedeira fagocita as SCV, ficando estas associadas à membrana de um endossoma (0-1 h). Após acidificação do vacúolo, as SCV diferenciam-se em LCV e estas iniciam o processo de replicação. Por volta do sexto dia pós infeção, as LCV retornam à forma de SCV, até que o VP se apresente praticamente preenchido por estas. Dá-se então a lise celular, com libertação das SCV para o ambiente. (Adaptado de ³⁹)	10
Figura 7 - Vias de transmissão de <i>Coxiella burnetii</i> . (Adaptado de ⁴³)	19
Figura 8 - Distribuição dos casos confirmados de febre Q por país pertencente à UE e/ou EEE em 2019 ¹²⁹	24
Figura 9 - Progressão natural da infeção por <i>Coxiella burnetii</i> em humanos. ⁴⁴	32
Figura 10 - Possíveis desfechos de uma infeção intrauterina por <i>Coxiella burnetii</i> em animais gestantes. O conhecimento da disseminação intrauterina de <i>C. burnetii</i> é limitado, pelo que os dados mais recentes indicam que a infeção pode seguir um de dois trajetos mais prováveis: uma infeção latente (setas verdes) que permanece localizada na placenta ou se dissemina ao feto, mantendo-se latente, correspondendo ao desfecho mais comum nos bovinos; uma infeção ativa (setas vermelhas) que pode permanecer limitada à placenta ou disseminar-se ao feto, por via hematogénica ou transplacentária, podendo resultar em abortos, partos prematuros, nados-mortos e fetos inviáveis, que juntos constituem o Complexo APSW. (Adaptado de ²²⁸).....	39
Figura 11 - Distribuição das explorações de bovinos leiteiros participantes no presente estudo, consoante o resultado da análise das amostras de BTM, na região de Rio Mau, Vila do Conde.	65

Índice de tabelas

Tabela 1 - Lista de espécies suscetíveis a infeção por <i>Coxiella burnetii</i> , com base em múltiplos estudos realizados em vários países. (Adaptado de ⁴³)	13
Tabela 2 - Distribuição do número casos confirmados de febre Q (C) e número de notificações por cada 100 000 habitantes (T), por país pertencente à UE e/ou EEE e por ano, no período de 2015 a 2019. .: não foram reportados dados; -: não foi calculada a taxa de notificação ¹²⁹	23
Tabela 3 - Casos confirmados de febre Q na Região Norte de Portugal e na Área Metropolitana do Porto, entre 2009 e 2018 ^{130,131}	24
Tabela 4 - Casos confirmados de febre Q nos concelhos de Póvoa de Varzim e Vila do Conde, entre 2014 e 2022 ¹³²	24
Tabela 5 - Valores de seroprevalência de anticorpos anti-C. burnetii obtidos em vários estudos com populações de diferentes países.	26
Tabela 6 – Prevalência molecular e serológica de <i>Coxiella burnetii</i> nos ruminantes domésticos, obtida em vários estudos realizados por países europeus. R: Referência Bibliográfica; TL: Técnica Laboratorial	28
Tabela 7 - Prevalência molecular e serológica de <i>Coxiella burnetii</i> em ruminantes domésticos, obtida em vários estudos realizados em Portugal. BOV: Bovinos; CAP: Caprinos; OV: Ovinos; PR: Explorações mistas de caprinos e ovinos; R: Referência Bibliográfica; TL: Técnica Laboratorial	31
Tabela 8 - Possíveis diagnósticos diferenciais de coxielose nos ruminantes domésticos. BVDV: Vírus da diarreia viral bovina; BHV-1: Herpesvírus bovino tipo 1; R: Referência bibliográfica... ..	42
Tabela 9 - Métodos de diagnóstico diretos e tipos de amostra mais utilizados na deteção de evidências de infeção por <i>Coxiella burnetii</i> ²⁵⁵	44
Tabela 10 - Métodos de diagnóstico indiretos e tipos de amostra mais utilizados na deteção de evidências de exposição prévia a <i>Coxiella burnetii</i> ²⁵⁵	46
Tabela 11 - Passos da amplificação de DNA pelo PCR em tempo real. ⁽¹⁾ : A recolha da informação relativa à fluorescência é efetuada nesta fase.	53
Tabela 12 - Critérios de validação do teste de PCR em tempo real. ⁽¹⁾ : Referente aos valores listados na secção 2.1 “EPC” do Certificado de Análise para o lote utilizado no teste; ⁽²⁾ : O valor do IPC no EPC não deve ser utilizado para validação do teste.	54
Tabela 13 - Interpretação dos resultados do PCR em tempo real.	54
Tabela 14 - Interpretação dos resultados obtidos após análise das amostras de BTM pelo teste PrioCHECK™ Ruminant Q fever Ab Plate Kit.	56
Tabela 15 - Caracterização das 25 explorações a nível de condições gerais e saúde dos efetivos. ^a : animais/km ² ; ^b : sem informação de uma das explorações; Min-Máx: valor mínimo e máximo; P ₂₅ , P ₅₀ e P ₇₅ : valor máximo verificado em 25%, 50% e 75% das explorações, respetivamente.	58
Tabela 16 - Resultados do PCR em função das condições gerais das explorações e saúde dos efetivos. ^a : Estatística e valor-p do teste não paramétrico de Mann-Whitney.....	66

Tabela 17 - Resultados do PCR em função das condições de biossegurança das explorações. ^a : Categoria de referência; NA: Não aplica; QN: Quando necessário.....	68
Tabela 18 - Resultados do ELISA em função das condições gerais das explorações e saúde dos efetivos. a: Estatística e valor-p do teste não paramétrico de Mann-Whitney.....	69
Tabela 19 - Resultados do ELISA em função das condições de biossegurança das explorações. ^a : Categoria de referência; NA: Não aplica; QN: Quando necessário.	71
Tabela 20 - Inquérito realizado aos produtores de Rio Mau, Vila do Conde.....	78
Tabela 21 - Pressupostos dos testes paramétricos (PCR).	79
Tabela 22 - Pressupostos dos testes paramétricos (ELISA).....	80

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Distribuição das explorações por área coberta, número total de animais, densidade animal e número de vacas em lactação (n=25).	57
Gráfico 2 - Distribuição das 25 explorações por média de IA ou CN por animal, taxa anual de mastites, taxa anual de RMF e metrites/endometrites e taxa anual de abortos (n=25).	58
Gráfico 3 - Explorações com perímetro vedado em toda a sua extensão (n=25).	59
Gráfico 4 - Explorações com contacto de cães e gatos com os animais da exploração (n=25).	59
Gráfico 5 - Explorações com contacto de cães e gatos com os locais de armazenamento do alimento e material para as camas (n=25).	59
Gráfico 6 - Explorações que apresentam uma maternidade (n=25).	60
Gráfico 7 - Explorações que desinfetam regularmente a maternidade (n=19).	60
Gráfico 8 - Desinfetantes utilizados na maternidade (n=19).	60
Gráfico 9 - Explorações que utilizam o estrume da maternidade nos campos (n=19).	60
Gráfico 10 - Explorações que aplicam ou não algum tratamento aos chorumes antes se os aplicar nos campos (n=25).	60
Gráfico 11 - Destino dos produtos de parto (n=25).	61
Gráfico 12 - Uso de luvas descartáveis na manipulação dos produtos de parto (n=25).	61
Gráfico 13 - Uso de bata na manipulação dos produtos de parto (n=25).	61
Gráfico 14 - Explorações que utilizam o equipamento de proteção individual, usado na manipulação dos produtos de parto, noutras áreas da exploração (n=25).	61
Gráfico 15 - Explorações que desparasitam externamente os animais (n=25).	61
Gráfico 16 - Frequência da desparasitação (n=20).	61
Gráfico 17 - Fornecimento de vestuário próprio da exploração aos visitantes (n=25).	62
Gráfico 18 - Explorações que realizam uma desinfecção regular das instalações (n=25).	62
Gráfico 19 - Explorações que adquiriram novos animais nos últimos cinco anos (n=25).	62
Gráfico 20 - Produtores que afirmam ter algum conhecimento relativamente à febre Q (n=25).	63
Gráfico 21 - Produtores que estão familiarizados com o termo “zoonose” e que reconhecem a febre Q como uma zoonose (n=25).	63
Gráfico 22 - Explorações com historial de casos de febre Q (n=25).	63
Gráfico 23 - Explorações que vacinam os animais contra a coxielose (n=25).	63
Gráfico 24 - Resultados obtidos após a análise das amostras de BTM no teste de PCR (n=25).	64
Gráfico 25 - Resultados obtidos após a análise das amostras de BTM no teste de ELISA (n=25).	64
Gráfico 26 - Cruzamento dos resultados obtidos nos testes de PCR e ELISA em cada exploração (n=25).	64

Símbolos e abreviaturas

μL – Microlitro

μm – Micrómetro

Ac – Anticorpos

AMP – Área Metropolitana do Porto

BTM – Leite de tanque

CAT – Teste de aglutinação capilar

CAVC – Cooperativa Agrícola de Vila do Conde

CCS – Contagem de células somáticas

CCV – *Coxiella-containing vacuole*

CEPCD – Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças

CFT – Teste de fixação do complemento

CN – Cobrições naturais

CR3 – Recetor do complemento 3

Ct – *Cycle threshold*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio Padrão

EAU – Emirados Árabes Unidos

EEE – Espaço Económico Europeu

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EPC – Controlo positivo de amplificação

EUA – Estados Unidos da América

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IA – Inseminações artificiais

IFA – *Immunofluorescence assay*

IFN-γ – Interferão gama

IgG – Imunoglobulina G

IgG1 – Imunoglobulina G1

IgG2 – Imunoglobulina G2

IgM – Imunoglobulina M

IHC – Imunohistoquímica

INE – Instituto Nacional de Estatística

IPC – Controlo positivo interno

km – Quilómetro

km² – Quilómetro quadrado

LCV – *Large cell variant*

LPS – Lipopolissacáridos

M – Média

MAT – Teste de microaglutinação

mg – Miligrama

mL – Mililitro

NC – Controlo negativo de amplificação

NCS – Controlo negativo de extração

nm – Nanómetro

OD – Densidade ótica

OD_{amostra} – Densidade ótica da amostra

OD_{mNC} – Densidade ótica do controlo negativo

OD_{mPC} – Densidade ótica do controlo positivo

PCR – *Polymerase chain reaction*

PK – Proteinase K

PT – Portal da Transparência

QFS – Síndrome de fadiga pós-febre Q

qPCR – PCR quantitativo

RMF – Retenção das membranas fetais

RP – Razão de prevalência

RT-qPCR – PCR de transcrição reversa quantitativa

SCV – *Small cell variant*

SDC – *Small dense cell*

SNIRA – Sistema Nacional de Informação e Registo Animal

UE – União Europeia

VP – Vacúolo Parasitóforo

X² – Teste do qui-quadrado

I. Revisão bibliográfica

1 Introdução: Uma abordagem histórica à febre Q

1.1 Brisbane, Queensland

Em agosto de 1935, Edward Holbrook Derrick, diretor do Laboratório de Microbiologia e Patologia do Departamento de Saúde de Queensland, foi chamado a investigar um surto de doença febril em trabalhadores de matadouro em Brisbane.^{1,2} Dada a sua natureza desconhecida e o facto de apenas se ter verificado em trabalhadores destes estabelecimentos, passou a ser designada de *abattoir fever* ou “febre do matadouro”.³

À primeira vista, os sintomas eram semelhantes aos observados em situações de febre tifoide, mas a evolução da doença era diferente, dado que os pacientes apresentavam melhorias consideráveis num espaço de tempo mais curto.³ Após uma investigação inicial, Derrick descobriu que os primeiros casos ocorreram em 1933 num matadouro central, onde se procedia à maioria dos abates de animais na área de Brisbane, sendo que nos 30 meses subsequentes se verificaram pelo menos 20 casos entre os 800 trabalhadores desse estabelecimento. No entanto, em matadouros mais antigos, incluindo um adjacente ao afetado, não ocorreu qualquer caso. A diferença crucial entre os estabelecimentos não afetados e o matadouro central assentava no facto de os primeiros apenas procederem ao abate para exportação, sendo que o último também procedia ao fornecimento de carne para consumo doméstico, sendo que Derrick só conseguiu entender a sua importância anos mais tarde.^{2,3} De seguida, de forma a identificar a espécie responsável por transmitir a doença, assim como o local onde a incidência de casos era maior, Derrick analisou todas as secções do matadouro nas quais trabalhavam os operadores afetados, concluindo que em todos os departamentos se verificaram casos positivos, com alguns dos trabalhadores a contactar com bovinos, porcos ou ovelhas.^{3,4} Apesar de não ser possível retirar muitas conclusões, verificou-se que o departamento com o maior número de casos era o local onde as vísceras eram recolhidas, fervidas e convertidas em fertilizante.³

No seguimento de vários testes serológicos e culturas de sangue negativos, Derrick decidiu inocular sangue e urina de pacientes afetados em porquinhos-da-índia, acabando estes por manifestar febre cerca de uma a duas semanas após a inoculação. No seguimento destas experiências, observou-se que a transferência de sangue ou emulsões de tecido hepático ou esplénico destes animais febris para animais saudáveis, que nunca tinham contactado previamente com a doença, também levou a manifestações de febre, o que permitiu concluir que se tratava duma doença infecciosa. Por sua vez, a inoculação de material proveniente de animais infetados em animais recuperados provou-se incapaz de reproduzir os sinais clínicos esperados, o que indicava que se teria desenvolvido algum tipo de imunidade específica após o primeiro contacto.

Derrick definiu então a sua estratégia, inoculando sangue e urina de pacientes afetados em dois porquinhos-da-índia, um nunca previamente infetado e o outro já recuperado, constatando precisamente que o primeiro desenvolveu febre, ao contrário do último, confirmando assim o diagnóstico.²

Apesar de todo o progresso, Edward Derrick encontrou dificuldades em isolar o agente etiológico, sendo que não conseguia observar qualquer microrganismo em esfregaços de sangue, fígado ou baço de porquinhos-da-índia infetados, nem obter culturas positivas, pelo que concluiu que a doença seria de origem viral.³ Para confirmar as suas suspeitas, Derrick enviou material infeccioso para Frank Macfarlane Burnet e Mavis Freeman, ambos colegas no *Walter and Eliza Hall Institute*, em Melbourne. Estes, por sua vez, foram bem sucedidos em reproduzir a infecção em ratos e macacos, conseguindo eventualmente isolar e observar numerosos coccobacilos intra e extracelulares semelhantes a riquetsias.^{2,3}

Procurando identificar o agente etiológico, Burnet solicitou amostras de sangue de pacientes e animais afetados com a maioria das riquetsioses conhecidas, constatando que todos os testes de aglutinação com emulsões de *Rickettsia burnetii*, nome atribuído na época ao agente causador da “febre do matadouro”, se revelaram negativos, o que indicava que se tratava de um microrganismo diferente de todos os testados.⁵

Derrick, por sua vez, procurava encontrar um nome que melhor se adequasse a esta nova doença, dado que, para além de ser pouco popular com a indústria da carne, “febre do matadouro” era uma designação incorreta, uma vez que já tinham sido reportados casos em pacientes sem ligações a estes estabelecimentos. Com alguma dificuldade, Edward Derrick decidiu apelidar esta nova doença de *Q fever*, de *query*, que significava precisamente “o desconhecido”, publicando o primeiro artigo relacionado com a febre Q em 1937, onde descreveu os seus ensaios clínicos e experiências com animais.²

1.2 Hamilton, Montana

Simultaneamente, na primavera de 1935, Gordon Davis, microbiologista no Laboratório de Rocky Mountain, em Hamilton, Montana, investigava um agente infeccioso obtido a partir de um grupo de 200 carraças (*Dermacentor andersoni*), recolhidas em Nine Mile, Montana.^{1,6}

Estas tinham sido divididas em quatro grupos de 50, com cada grupo colocado numa cápsula acoplada à barriga de um porquinho-da-índia, de forma que as carraças se alimentassem do mesmo. Dos quatro porquinhos-da-índia, um morreu no segundo dia, de causa desconhecida, outro desenvolveu febre e os restantes apresentaram-se afebris. Seguidamente, foi retirado sangue do animal afetado, por punção intracardíaca, sendo este transferido para os dois animais restantes, por via intraperitoneal. O dador acabou por morrer sete dias após a recolha, tendo os outros dois animais desenvolvido febre de 40,4°C e 40,6°C ao 4º dia após a inoculação, que se demonstrou presente até à morte de ambos ao 14º e 17º dia, respetivamente.⁶

De forma a isolar e identificar o agente causador da “febre de Nine Mile”, como ficou apelidada, Herald Cox, também microbiologista, associou-se a Davis, desenvolvendo várias formas de transmitir e reproduzir a doença em novos pacientes. Em 1937, após inocular porquinhos-da-índia com suspensões de tecido esplênico de animais previamente infetados por via subcutânea, Cox decidiu estudar o exsudado inflamatório provocado pela inoculação, conseguindo então observar vários microrganismos intra e extracelulares, semelhantes a

riquétsias.² No ano seguinte, Cox procedeu à inoculação de material infeccioso diretamente na membrana do saco vitelino de ovos de galinhas férteis, tendo sido bem sucedido na propagação da infeção e podendo observar milhares de microrganismos.^{1,2}

As notícias do seu sucesso chegaram a Rolla Dyer, médico infeciologista no *National Institutes of Health*, em Washington, DC, que por sua vez se demonstrava cético em relação à veracidade da informação reportada por Cox. Após visitar as instalações em Montana e estudar os dados obtidos, Dyer chegou à conclusão de que Cox estava certo. Nos cinco dias em que esteve no laboratório, Dyer manipulou porquinhos-da-índia infetados, tendo também inoculado ovos de galinhas férteis, sem qualquer tipo de acidente aparente. No entanto, assim que retornou a Washington, Dyer desenvolveu febre, suores noturnos excessivos e dores articulares durante vários dias.²

1.3 A ponte entre Austrália e Estados Unidos da América

Dado que Rolla Dyer desenvolveu uma febre após a sua visita ao Laboratório de Rocky Mountain, a possibilidade de esta ter como causa o agente da “febre de Nine Mile” era elevada, pelo que se procedeu à realização de vários testes para o isolar e identificar. Recolheu-se sangue de Dyer na fase aguda da sua doença, o qual foi posteriormente inoculado em porquinhos-da-índia, que acabaram por manifestar febre nos seguintes dias. Após a recolha de amostras de baço dos animais infetados, observaram-se microrganismos semelhantes a riquétsias.¹ Testes de imunidade cruzada com microrganismos obtidos em Montana confirmaram então que Dyer tinha desenvolvido “febre de Nine Mile”.²

No entanto, o agente causador da doença ainda se encontrava por identificar. Vários testes em animais foram realizados, mas nenhum obteve sucesso, sendo que o agente causal da “febre de Nine Mile” parecia ser diferente de todos os microrganismos já estudados. Em abril de 1938, Burnet enviou a Dyer amostras de baço de ratos infetados com o agente causal da febre Q. Estas amostras, quando inoculadas em porquinhos-da-índia, manifestaram a resposta característica. Posteriormente, Dyer procedeu à inoculação de cinco desses mesmos animais, agora com o agente causal da “febre de Nine Mile”, sendo que nenhum manifestou febre. Isto era então indicativo de que os agentes causadores da “febre de Nine Mile” e da febre Q não eram dois microrganismos distintos, mas sim o mesmo.^{1,2}

Mais tarde, Dyer constatou que o seu soro aglutinava os microrganismos causadores da febre Q e estudos em porquinhos-da-índia demonstraram imunidade cruzada completa entre os agentes causais das duas doenças.⁷ Burnet acabou por confirmar as observações de Dyer, afirmando que os dois microrganismos eram imunologicamente idênticos.^{2,8}

1.4 Nomenclatura

Tendo em conta que a febre Q era diferente de todas as outras riquetsioses conhecidas, Derrick achou necessário classificar este novo microrganismo. *Rickettsia burneti* foi então a

nomenclatura sugerida, que publicou em 1939, de forma a honrar Burnet, uma vez que este foi o primeiro a isolar o agente etiológico com sucesso.⁹

Esta designação prevaleceu até 1948, tendo sido eventualmente atribuído um novo Género à bactéria, uma vez que esta possuía características diferentes das riquetsias, nomeadamente a capacidade de atravessar filtros onde muitas das restantes ficavam retidas. Assim, surgiu a designação de *Coxiella burnetii*, em honra de Cox e Burnet.^{2,10}

1.5 Importância da febre Q na atualidade

A febre Q é uma doença de notificação obrigatória na Europa, estando integrada na lista de Doenças de Declaração Obrigatória da Direção Geral da Saúde desde 1999, em Portugal.^{11,12} Dada a elevada variedade de sintomas e apresentações clínicas, assim como o tempo desde a exposição a *C. burnetii* e o início da sintomatologia, a incidência de febre Q em humanos é subdiagnosticada. Esta permanece uma doença pouco compreendida, variando de formas subclínicas a manifestações severas, com resultados potencialmente fatais.¹³

A nível das espécies pecuárias, a *Coxiella burnetii* também se encontra amplamente distribuída, tendo a sua prevalência vindo a aumentar nos últimos anos. Muitas vezes negligenciada em diagnósticos diferenciais, a coxielose pode persistir numa exploração e, consequentemente, causar prejuízos elevados a longo prazo para o produtor.¹⁴ Nos Países Baixos, duas explorações de caprinos leiteiros diagnosticadas com coxielose levaram à ocorrência do maior surto em humanos alguma vez observado, registando-se 4026 casos de febre Q entre 2007 e 2010, e estimando-se que, nas áreas mais afetadas, até 15% da população possa ter sido infetada (Figura 1).^{15,16} Adicionalmente, nos três anos após o início do surto, foram registadas 19 mortes, 732 hospitalizações, abatidos aproximadamente 60 000 caprinos e vacinados cerca de 500 000 animais. De forma a avaliar o impacto socioeconómico deste surto, considerando os fundos despendidos em cuidados de saúde, a perda de qualidade de vida da população infetada e a implementação de medidas de controlo da doença, vários estudos apontam para um prejuízo estimado de 161 a 600 milhões de euros.^{17,18}

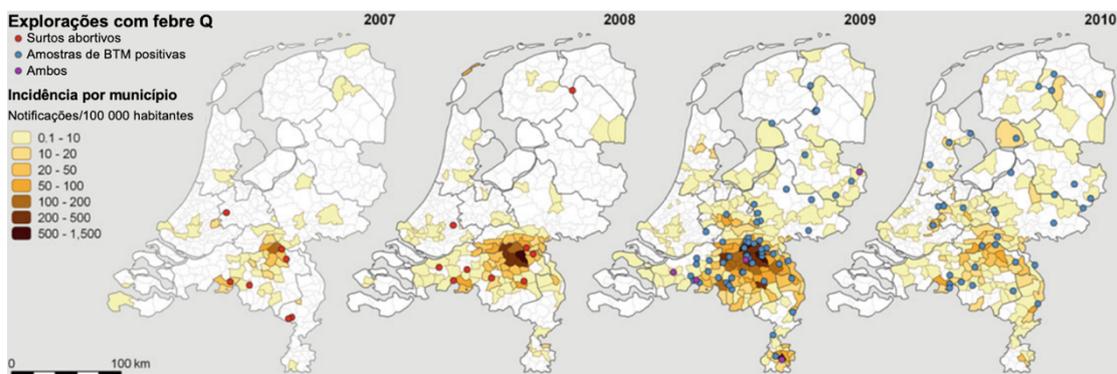


Figura 1 - Incidência anual de febre Q aguda por município e localização das explorações infetadas, no período de 2007 a 2010, nos Países Baixos. BTM: leite de tanque (Adaptado de ¹⁵)

2 Caracterização do agente etiológico

2.1 Taxonomia

Tendo em conta a sua incapacidade de crescer em meios de cultura axénicos e o facto de ter sido isolada a partir de carraças, a *C. burnetii* foi inicialmente integrada na família *Rickettsiaceae*, juntamente com os géneros *Rickettsia* e *Rochalimaea*. Mais tarde, estudos filogenéticos comprovaram, através de sequenciação de genes (16S rRNA), que *Coxiella burnetii* pertence ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Legionellales* e família *Coxiellaceae*. Os seus parentes filogenéticos mais próximos incluem *Legionellae* spp, *Francisella tularensis* e *Rickettsiella* spp, sendo que todas estas bactérias apresentam a capacidade de se multiplicar no interior de outras células (Figura 2).^{19,20}

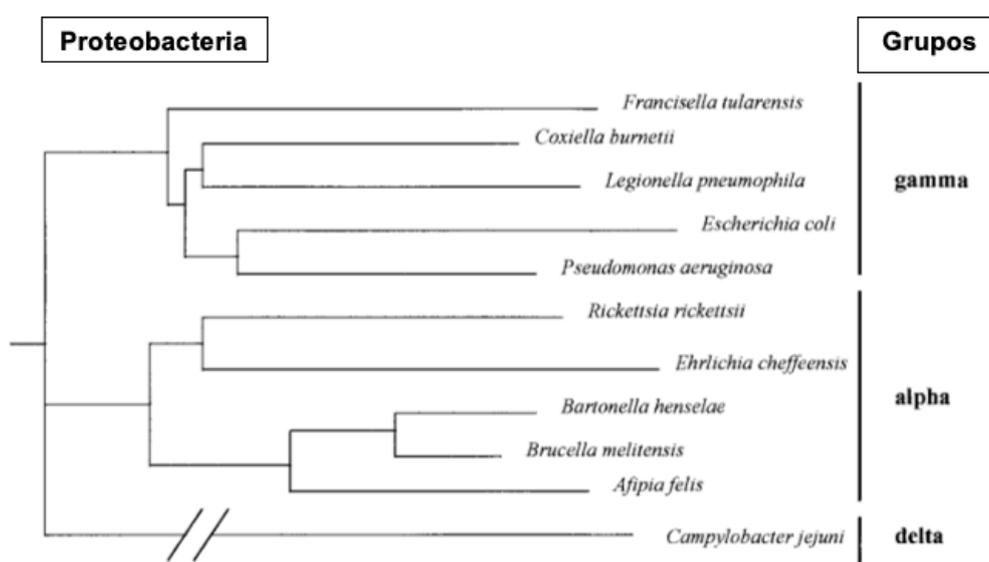


Figura 2 - Árvore filogenética representativa das relações de *C. burnetii* com outras espécies pertencentes ao filo *Proteobacteria*, obtida através de sequenciação de genes (16S rRNA)¹

2.2 Morfologia

A *Coxiella burnetii* é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória, de pequenas dimensões, com cerca de 0,2 a 0,4 μm de largura e 0,4 a 1,0 μm de comprimento. Assume a forma de um pequeno bastonete pleomórfico e, apesar de apresentar uma membrana celular semelhante a outras bactérias gram-negativas, raramente é corada pela técnica de Gram, sendo o método de Gimenez o mais utilizado para o efeito.¹

A sua parede celular divide-se em duas membranas, uma externa e uma interna, sendo que a externa é principalmente constituída por fosfolípidos, lipopolissacáridos (LPS) e proteínas. As duas membranas são separadas por uma camada de peptidoglicanos, que adera à face interior da membrana externa, e pelo espaço periplasmático, como podemos observar na Figura 3.²¹

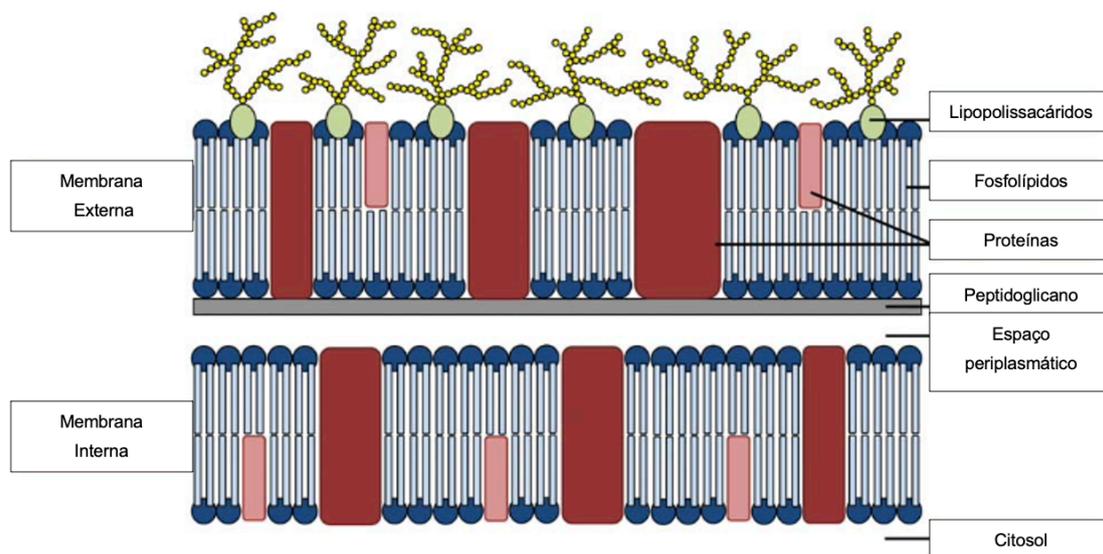


Figura 3 - Estrutura da parede celular de *Coxiella burnetii*. (Adaptado de ²¹)

No decorrer do seu ciclo de desenvolvimento, é possível observar três formas morfológicamente distintas por microscopia eletrônica, sendo estas as *large cell variants* (LCV), *small cell variants* (SCV) e *small dense cells* (SDC).²¹

As LCV correspondem à forma intracelular e metabolicamente ativa da bactéria, podem atingir 1,0 μm de comprimento, são mais pleomórficas e apresentam filamentos de cromatina dispersos pelo citoplasma. Por sua vez, as SCV e SDC correspondem às formas extracelulares, de menores dimensões, altamente resistentes às pressões ambientais como choque osmótico, temperaturas elevadas, dissecação, radiação ultravioleta e a vários desinfetantes. Estas variantes também se distinguem das LCV pela conformação da cromatina, que se apresenta condensada ao invés de dispersa. As SDC representam um subpopulação de bactérias com maior estabilidade que as SCV, sendo visualizadas como endósporos resultantes da lise de algumas LCV durante o decorrer do ciclo de desenvolvimento da bactéria.²²

No entanto, foi reportado que as SDC não são suscetíveis aos corantes utilizados para esporos, nem são detetadas em testes para o ácido dipicolínico, um marcador tradicional dos esporos bacterianos. A hipótese das SDC se diferenciarem em SCV já terá sido abordada, mas, tendo em conta que estas partículas ainda não foram isoladas e purificadas, não foi possível comprová-lo.²³

Estas três variantes, representadas na Figura 4, formam-se consoante as necessidades da bactéria, conferindo-lhe assim a capacidade de sobreviver dentro e fora da célula hospedeira.^{21,24,25}

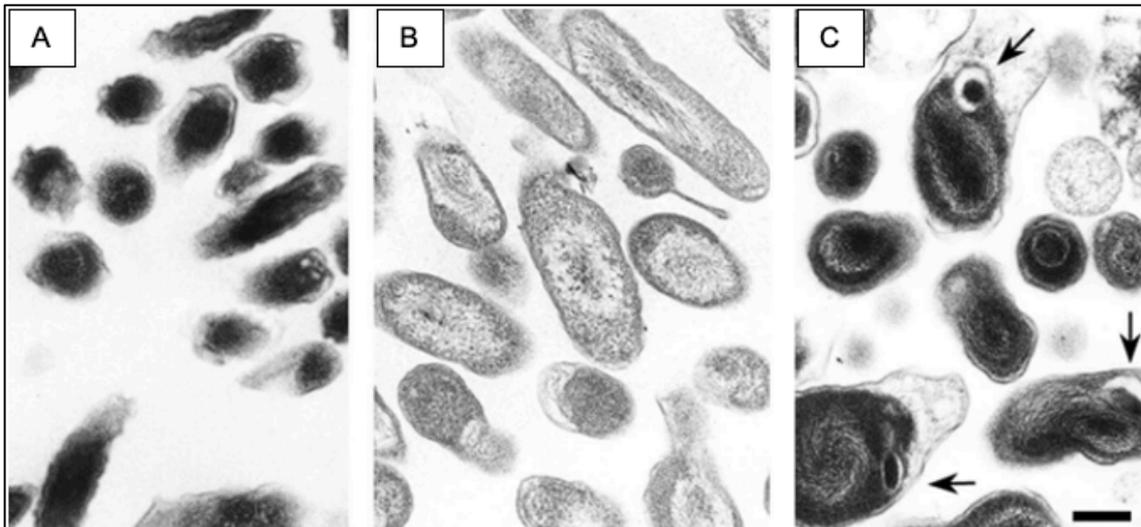


Figura 4 - Visualização das três variantes de *C. burnetii* por microscopia eletrónica. (A) SCV purificadas, sendo possível observar a característica cromatina condensada. (B) LCV purificadas, observando-se a cromatina dispersa pelo citoplasma. (C) LCV purificadas com presença de partículas semelhantes a endósporos, SDC (setas pretas), num dos seus polos. Escala = 2 μm .²⁶

2.3 Variação antigénica

Tal como se observa em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, a *C. burnetii* sofre alterações a nível do seu grau virulência através de um processo de truncação dos LPS, designado de variação de fase. Esta resulta de mutações genómicas e, ao contrário do que se observa noutras bactérias gram-negativas, é um processo irreversível onde ocorre a transição de uma forma virulenta de fase I, com LPS liso, para uma forma avirulenta de fase II, com LPS truncado.²⁷

O LPS de fase I da *C. burnetii* contém quantidades significativas de dois sacarídeos a nível do antígeno O, virenose e dihidrohidroxistreptose, os quais não estão presentes no LPS de qualquer outra bactéria, servindo como biomarcadores únicos deste microrganismo.^{28,29} Está descrito que, quando ocorre a mudança de fase, o LPS das bactérias de fase I reduz gradualmente a sua cadeia de polissacáridos O. Em mapeamentos genéticos relativos à biossíntese deste antígeno em estirpes Nine Mile de fase II de *C. burnetii*, verificou-se uma deleção de grandes grupos de genes, havendo, no entanto, alguns isolados sem nenhuma deleção aparente.³⁰

O LPS de fase II contém o lípido A e alguns sacarídeos estruturais, tal como se verifica no LPS de fase I, mas não apresenta o antígeno O. Estas alterações a nível da estrutura do LPS durante o processo de variação de fase parecem ser responsáveis pela perda de virulência da bactéria.³¹

As bactérias de fase I são encontradas naturalmente em animais, artrópodes e humanos infetados. Nesta fase, a *C. burnetii* é capaz de interferir com a resposta imune da célula hospedeira, sobrevivendo e multiplicando-se no seu interior, correspondendo, portanto, à forma infecciosa. Por sua vez, as bactérias de fase II apresentam baixa infecciosidade, sendo apenas

obtidas em laboratório após várias passagens em culturas de células ou ovos embrionados. A relevância desta forma em infeções naturais permanece questionável.^{1,32}

2.4 Células suscetíveis e ciclo de vida

A *C. burnetii* pode ser cultivada *in vitro*, em células de rato semelhantes a macrófagos, em fibroblastos e em células Vero, L-929, HEL, BHK-21, HeLa e CHO, ou *in vivo*, em ovos embrionados e animais de laboratório como ratos e porquinhos-da-índia. Em humanos e animais, a bactéria apresenta tropismo para as células do sistema mononuclear fagocitário, como macrófagos alveolares e células de *Kupffer* do fígado, sendo menos frequentemente observadas em pneumócitos, fibroblastos e células endoteliais. A *Coxiella burnetii* é um dos microrganismos mais infecciosos que se conhece, sendo que, uma a dez bactérias viáveis são suficientes para provocar uma infeção sintomática em porquinhos-da-índia, servindo estes como o modelo mais adequado para estudar os sintomas de febre Q em humanos.^{1,33}

A infeção inicia-se com a entrada de SCV na célula hospedeira eucariótica, tipicamente monócitos/macrófagos alveolares, por fagocitose e endocitose dependente de microfilamentos, mediada pela integrina $\alpha\beta3$ e pelo recetor do complemento 3 (CR3).^{33,34} A integrina $\alpha\beta3$ encontra-se tipicamente envolvida na remoção de células apoptóticas, estando este processo associado a uma inibição da inflamação. Como tal, ao ligar-se a este recetor, a *Coxiella burnetii* é capaz de tirar partido deste mecanismo e assim evitar a indução de um processo inflamatório durante a invasão da célula hospedeira, permitindo à bactéria escapar ao sistema imunitário.³⁵ No caso de células não fagocitárias, que não possuem estes recetores específicos, a presença da proteína de membrana OmpA comprovou ser essencial para que a invasão celular por *C. burnetii* possa ocorrer.³⁴

Como referido anteriormente, a *Coxiella burnetii* demonstra alterações a nível do LPS durante o processo de variação de fase, sendo que estas estão diretamente relacionadas com a capacidade do microrganismo de encobrir a sua membrana externa. Graças ao seu LPS completo, as bactérias de fase I conseguem impedir a ligação de anticorpos contra as suas proteínas de superfície e camuflar os seus recetores *toll-like* (TLR), impossibilitando o seu reconhecimento pelas células dendríticas.³³ Está descrito que a interação de *Coxiella burnetii* de fase I com monócitos THP-1 é capaz de provocar nestas células uma reorganização profunda do citoesqueleto de actina e induzir a formação de protusões membranares no local de adesão, algo que não se verifica com bactérias de fase II. O LPS de fase I poderá então ter a capacidade de inibir a interação do microrganismo com recetores CR3 dos macrófagos, tornando o processo de fagocitose menos eficiente.³⁶

Apesar da reorganização de actina ser um mecanismo utilizado por vários agentes patogénicos para aumentar a eficiência da internalização pela célula hospedeira, verifica-se que as variantes virulentas são fagocitadas de forma menos eficiente que as variantes avirulentas. Isto deve-se ao facto da *C. burnetii* de fase II não interferir com a atividade do recetor CR3, uma

vez que não induz alterações a nível do citoesqueleto de actina. No entanto, assim que são fagocitadas, as variantes avirulentas são, eventualmente, eliminadas pelos monócitos.³⁷

Do processo de fagocitose resulta a formação do fagossoma, que, após maturação e fusão com o lisossoma, dá origem a um compartimento muito semelhante a um fagolisossoma, denominado vacúolo parasitóforo (VP) ou *coxiella-containing vacuole* (CCV), o qual se encontra representado na Figura 5.³⁸ Este compartimento apresenta características essenciais para a atividade metabólica e replicação de *C. burnetii*, tais como pH ácido de aproximadamente 4,5 e a presença de enzimas proteolíticas, sendo capaz de se fundir com endossomas, autofagossomas e outros CCVs para facilitar a sua expansão e maturação.^{39,40} Dado que o VP de *C. burnetii* não é passivamente permeável a pequenas moléculas, as interações precoces com autofagossomas são essenciais para fornecer às bactérias os aminoácidos e sacarídeos necessários para regular o seu metabolismo e iniciar o processo de diferenciação das SCV em LCV, sendo que interações mais tardias permitem fornecer os metabolitos necessários para que as LCV possam replicar-se. Adicionalmente, tendo em conta que a *Coxiella burnetii* é incapaz de sintetizar a membrana do seu próprio VP, múltiplos eventos de fusão com autofagossomas e vacúolos endolisossomais são essenciais para garantir a integridade da parede do VP à medida que este aumenta gradualmente o seu volume.³³

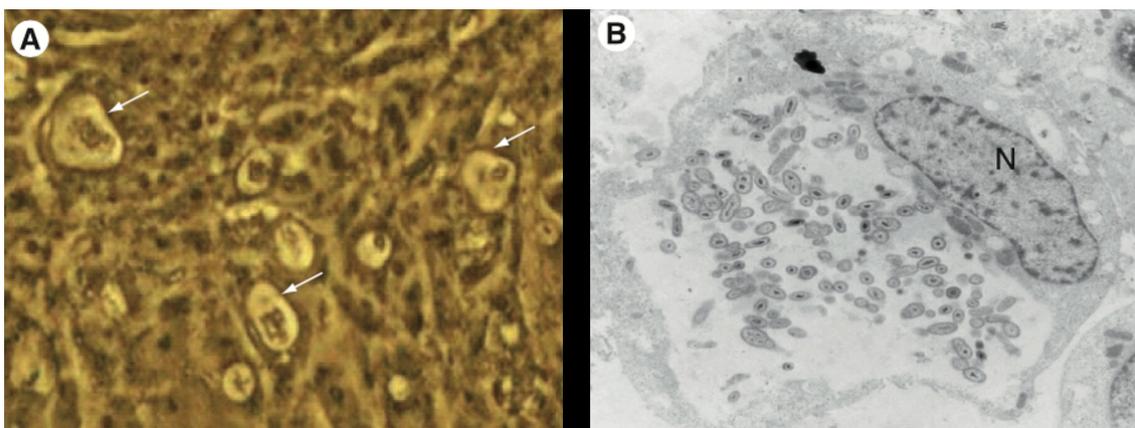


Figura 5 - Vacúolo parasitóforo de *Coxiella burnetii*. (A) Observação de vários vacúolos parasitóforos (setas brancas) por microscopia de contraste de fase numa célula Vero infetada, quatro dias pós infeção. (B) Observação de um vacúolo parasitóforo de grandes dimensões por microscopia eletrónica de transmissão numa célula Vero infetada, quatro dias pós infeção. O núcleo da célula hospedeira (N) encontra-se empurrado para a periferia da célula pelo VP.³⁹

Após entrada na célula e acidificação do meio, segue-se então uma fase *lag* de aproximadamente dois dias, onde as SCV sofrem um processo de diferenciação. Por sua vez, as LCV resultantes iniciam o processo de replicação, por divisão binária, numa fase *log* de cerca de quatro dias e com um tempo de geração próximo de 11 horas. Seis dias após a entrada da *C. burnetii* na célula hospedeira, as LCV iniciam um novo processo de diferenciação, sendo que, ao 8º dia, praticamente metade da população bacteriana se encontra novamente na forma de SCV. Por fim, ao 12º dia, o CCV já se apresenta praticamente preenchido por SCV, tendo

consumido quase todo o volume da célula hospedeira, ocorrendo eventualmente a lise celular e liberação das SCV para que o ciclo se possa repetir (Figura 6).^{26,38,39}

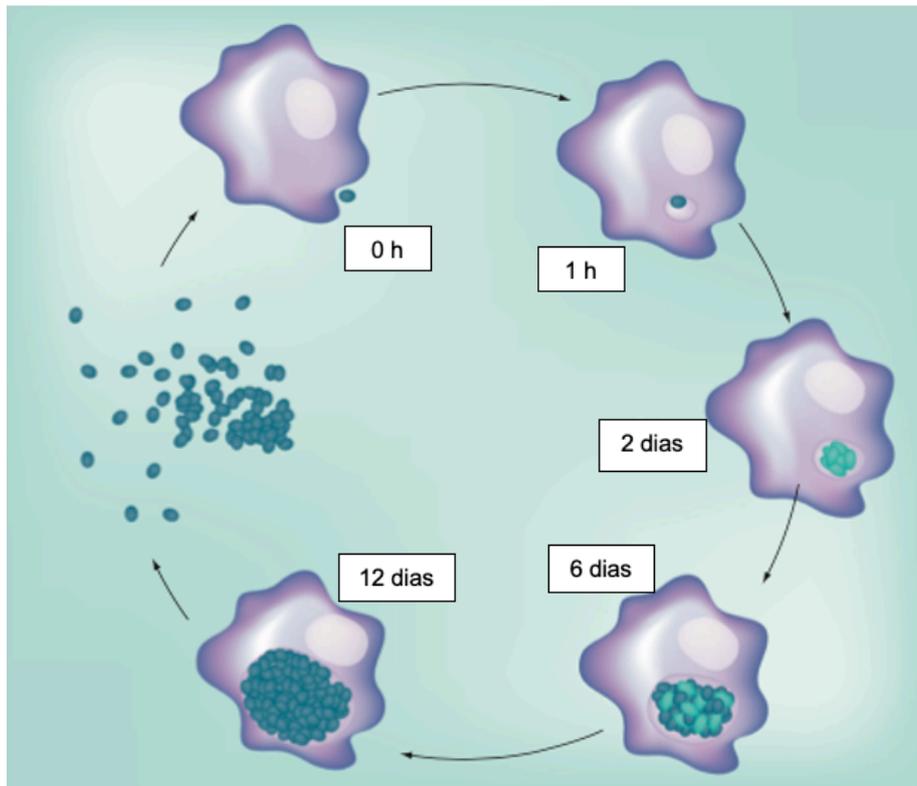


Figura 6 - Ciclo de vida de *Coxiella burnetii*. Uma célula hospedeira fagocita as SCV, ficando estas associadas à membrana de um endossoma (0-1 h). Após acidificação do vacúolo, as SCV diferenciam-se em LCV e estas iniciam o processo de replicação. Por volta do sexto dia pós infecção, as LCV retornam à forma de SCV, até que o VP se apresente praticamente preenchido por estas. Dá-se então a lise celular, com liberação das SCV para o ambiente. (Adaptado de ³⁹)

As SCV não aparentam ser formas replicativas, uma vez que a fase lag é caracterizada principalmente pela diferenciação das SCV em LCV, apenas reaparecendo novamente em números significativos no início da fase estacionária. Pelo contrário, as LCV são tidas como as responsáveis pela replicação de *C. burnetii*, dado que só se observam quase exclusivamente na fase de crescimento exponencial. A replicação parece terminar assim que surgem novamente as formas de SCV após a diferenciação das LVC.^{26,41}

Por sua vez, as SDC apresentam-se como estruturas semelhantes a endósporos, sendo libertadas após divisão binária ou lise de algumas LCV, abandonando a célula hospedeira em simultâneo com as SCV.²² As SDC poderão ter a capacidade de se diferenciar em SCV mas ainda não foi possível comprová-lo.²³

3 Epidemiologia

3.1 Reservatórios

A febre Q é uma zoonose com distribuição mundial, exceto na Nova Zelândia, contando com um grande número de reservatórios, incluindo mamíferos, aves, répteis e artrópodes, nomeadamente carraças.^{42,43}

Os ruminantes domésticos como vacas, ovelhas e cabras constituem a principal fonte de infecção para os humanos, sendo a deteção e monitorização de rebanhos infetados muito importante no controlo da doença.⁴⁴ Dados epidemiológicos indicam que as infeções crónicas se verificam mais frequentemente em vacas leiteiras do que em ovelhas e, como tal, das principais fontes de infecção para os humanos, os bovinos poderão constituir a mais importante.¹

As infeções por *Coxiella burnetii* têm sido reportadas com menos frequência noutros mamíferos domésticos, como é o caso dos cavalos, coelhos, porcos, búfalos, camelos, ratazanas e ratos.⁴⁵⁻⁵¹ Apesar das evidências serológicas de infeção reportadas ao longo dos anos, o papel dos cavalos como reservatório de *C. burnetii* ainda não foi adequadamente estudado.⁵²

O coelho-europeu (*Oryctolagus cuniculus*), nativo da Península Ibérica e introduzido na Austrália, Nova Zelândia, Chile e Argentina, assim como outras espécies de coelhos com distribuição mundial, representam um grande reservatório de *C. burnetii*. Isto deve-se principalmente a três características ecológicas específicas, sendo elas a grande densidade populacional, o comportamento gregário e as elevadas taxas de reprodução.^{46,53}

Relativamente aos suínos, os estudos realizados sobre o seu papel na epidemiologia de *Coxiella burnetii* são limitados. Apesar da presença de anticorpos em amostras de soro ter permitido confirmar a sua suscetibilidade à infeção, ainda não existem grandes evidências que os porcos tenham um papel ativo como reservatório de *C. burnetii*. Adicionalmente, a transmissão de *C. burnetii* de porcos para humanos ainda não foi comprovada.⁴⁷

O búfalo-asiático (*Bubalus bubalis*) representa uma espécie pecuária de grande importância global, uma vez que produz leite de alta qualidade, sendo também procurado pela sua carne e couro.⁴³ A prevalência de febre Q nestes animais já terá sido reportada em vários países, nomeadamente Índia e Egito, mas a sua importância económica e veterinária permanece por esclarecer.^{52,54}

O dromedário (*Camelus dromedarius*) constitui uma importante fonte de proteína para populações humanas em regiões áridas e semiáridas de África. No Quénia, a população destes animais tem vindo a crescer consideravelmente ao longo das últimas décadas, o que se traduz num maior risco de transmissão de doenças para os humanos, dado que estes animais podem representar um reservatório para vários agentes etiológicos com potencial zoonótico, como *Coxiella burnetii*.⁵⁵ Em estudos recentes, constatou-se que a seroprevalência de anticorpos anti-*C. burnetii* nos dromedários aumenta consideravelmente com a sua idade, ainda que a taxa de contágio entre indivíduos do mesmo grupo não aparente ser muito alta. Este aumento poderá ser justificado pela maior exposição a carraças no ambiente.⁵⁵⁻⁵⁸

As carrças desempenham um importante papel epidemiológico nos ciclos selvagens e peridomésticos de *Coxiella burnetii*, sendo que a bactéria já foi isolada em mais de 40 espécies da Família *Ixodidae* e em pelo menos 14 espécies da Família *Argasidae*. Apesar de não estarem frequentemente envolvidas em surtos nos ruminantes domésticos e em humanos, as carrças aparentam ser importantes na transmissão da bactéria entre outros vertebrados, como roedores, aves selvagens e lagomorfos.⁵⁹ Desde que a *C. burnetii* foi isolada pela primeira vez a partir de uma carrça (*Dermacentor andersonii*), vários estudos experimentais permitiram comprovar que a transmissão horizontal do agente para mamíferos, a partir de carrças, era possível. Apesar da transmissão transtadial se verificar na maioria das espécies estudadas, a transmissão vertical raramente foi reportada.⁶⁰ Deve ter-se em conta que, para que uma carrça possa ser considerada um vetor competente, esta necessita de cumprir três requisitos principais: (i) demonstrar a capacidade de adquirir *C. burnetii* a partir de um animal infetado, (ii) transmitir a infeção de larva até ao estado adulto, e (iii) ser capaz de transmitir *C. burnetii* a um novo animal. No entanto, vetores considerados competentes em condições de laboratório podem não demonstrar as mesmas capacidades de transmitir a infeção em condições naturais, uma vez que a densidade populacional, preferência de hospedeiro, frequência de alimentação e algumas restrições ambientais podem ter impacto na disseminação do agente. Isto poderá ser o caso para *Coxiella burnetii*.⁶¹

No que diz respeito aos animais de companhia, estes são capazes de transmitir pelo menos 40 doenças a humanos, seja de origem viral, bacteriana, fúngica ou parasitária.⁶² Os cães e os gatos estão descritos como causa de surtos de febre Q em humanos, sendo que a seroprevalência de *Coxiella burnetii* reportada varia consideravelmente entre países.⁶³⁻⁶⁶ No Japão, os gatos são considerados um dos reservatórios de *C. burnetii* mais importantes, dada a natureza assintomática das infeções nestes animais, tendo sido demonstrado que gatos de rua apresentam uma seropositividade de anticorpos anti-*C. burnetii* consideravelmente mais elevada do que gatos domésticos. Estes dados indicam que o ambiente onde os animais se inserem está diretamente relacionado com a prevalência da infeção por *C. burnetii*.⁶⁷ Estudos realizados em cães na Austrália demonstraram que uma maior seropositividade poderá estar relacionada com o contacto destes animais com a fauna selvagem, espécies pecuárias e carrças.⁶⁴ Ainda que os ruminantes domésticos constituam a principal fonte de infeção em humanos, os animais de companhia parecem ser responsáveis por um número crescente de surtos, tendo sido proposto que, em determinadas regiões, o papel de cães e gatos na transmissão de febre Q a humanos poderá até ser mais importante.⁶² No entanto, um estudo recente realizado em cães e gatos, em Portugal, permitiu concluir que, apesar de ter sido comprovado que estes animais contactam com *Coxiella burnetii*, o seu papel como fonte de infeção para os humanos não parece ser muito relevante neste país.⁶³

Dada a sua natureza comensal, tem sido demonstrado que as ratazanas (*Rattus norvegicus*) assumem um papel importante na disseminação de *C. burnetii* na natureza, tanto a animais domésticos como humanos.⁵⁰ O papel dos gatos na epidemiologia da febre Q parece resultar do seu comportamento predatório sobre as ratazanas, associado à alta prevalência de

Coxiella burnetii nestes reservatórios naturais.⁶⁸ Para além da sua natureza comensal, as ratazanas apresentam um habitat bastante extenso, sendo capazes de percorrer vários quilómetros em busca de alimento ou novos abrigos, os quais parecem mudar a cada uma ou duas semanas.^{69,70} Como tal, em explorações pecuárias, as ratazanas representam um possível meio de transmissão de *C. burnetii* aos animais domésticos, possibilitam a transmissão entre explorações vizinhas e podem constituir uma ponte entre os ciclos domésticos e silvestres da bactéria.⁵⁰

Tanto aves domésticas como selvagens podem ser afetadas por vários microrganismos transmissíveis a mamíferos, incluindo os humanos. Além disso, as aves também podem representar um meio de transporte para vários ixodídeos, frequentemente infetados com microrganismos patogénicos, introduzindo-os a novas áreas e contribuindo para a sua dispersão. Consequentemente, com o aumento da distribuição geográfica das carraças por meio das aves, novos agentes virais e bacterianos são introduzidos noutras regiões.⁷¹ As infeções naturais por *Coxiella burnetii* têm sido reportadas num elevado número de espécies, sendo que um estudo no Japão demonstrou elevada prevalência do agente em gralhas-pretas (*Corvus corone*), pombo-comum (*Columba livia*) e várias espécies de corvos.⁷² Galinhas, patos, perus e gansos também demonstraram a capacidade de ser infetados por *C. burnetii*, sendo que as primeiras aparentam ser as mais afetadas, representando uma possível fonte de infeção para os humanos.⁷³ No entanto, os estudos relativos à prevalência de *Coxiella burnetii* em diferentes regiões geográficas são escassos, sendo que os fatores que afetam a transmissão do agente, assim como a sua patogenia nestas espécies, permanecem por esclarecer.⁴³

Na Tabela 1, encontram-se listadas várias espécies com infeções reportadas por *C. burnetii*.

Tabela 1 - Lista de espécies suscetíveis a infeção por *Coxiella burnetii*, com base em múltiplos estudos realizados em vários países. (Adaptado de⁴³)

Família	Nome Comum	Nome Científico	País
AVES			
Accipitridae	Milhafre-preto	<i>Milvus migrans</i>	Espanha
	Grifo	<i>Gyps fulvus</i>	Espanha
Acrocephalidae	Rouxinol-pequeno-dos-caniços	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	Bulgária
Anatidae	Marrequinha-comum	<i>Anas crecca</i>	Itália
	Piadeira	<i>Anas penelope</i>	Itália
	Pato-real	<i>Anas platyrhynchos</i>	Japão; Rússia
Columbidae	Pombo-comum	<i>Columba livia</i>	Bulgária; Checoslováquia; Eslováquia; França; Itália; Japão
	Rola-brava	<i>Streptopelia turtur</i>	Bulgária
	Pombo-torcaz	<i>Columba palumbus</i>	Bulgária
Corvidae	Corvo-comum	<i>Corvus corax</i>	Bulgária
	Gralha-preta	<i>Corvus corone</i>	Japão
	Gralha-cinzenta	<i>Corvus cornix</i>	Rússia
	Pega	<i>Pica spp.</i>	Bulgária

	Gralha-calva	<i>Corvus frugileus</i>	Rússia
Hirundinidae	Andorinha-das-chaminés	<i>Hirundo rustica</i>	Checoslováquia
Laridae	Guincho-comum	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	Rússia
	Gaivota-parda	<i>Larus canus</i>	Rússia
	Andorinha-do-mar-comum	<i>Sterna hirundo</i>	Rússia
	Gaivina-d'asa-branca	<i>Chlidonias leucopterus</i>	Rússia
Motacillidae	Alvéola-amarela	<i>Motacilla flava</i>	Bulgária
	Alvéola-branca	<i>Motacilla alba</i>	Checoslováquia; Rússia
Muscicapidae	Rabirruivo-de-testa-branca	<i>Phoenicurus phoenicurus</i>	Checoslováquia
	Rouxinol-de-tordo	<i>Luscinia luscinia</i>	Bulgária
Passeridae	Pardal-comum	<i>Passer domesticus</i>	Rússia
	Pardal-italiano	<i>Passer italiae</i>	Itália
Pelecanidae	Pelicano-branco	<i>Pelecanus onocrotalus</i>	Bulgária
Phasianidae	Codorniz-comum	<i>Coturnix coturnix</i>	Japão; Rússia
	Galinha-comum	<i>Gallus gallus domesticus</i>	Bulgária; Checoslováquia
	Codorniz-japonesa	<i>Coturnix japonica</i>	Japão
	Faisão-comum	<i>Phasianus colchicus</i>	Bulgária
	Peru	<i>Meleagris spp.</i>	Checoslováquia
Phylloscopidae	Felosa-musical	<i>Phylloscopus trochilus</i>	Bulgária
Psittaculidae	Papagaio-ecletus	<i>Eclectus roratus</i>	EUA
Scolopacidae	Maçarico-bastardo	<i>Tringa graleola</i>	Bulgária
Sturnidae	Estorninho-malhado	<i>Sturnus vulgaris</i>	Rússia
Turdidae	Melro-preto	<i>Turdus merula</i>	Bulgária; Rússia
	Tordo-zornal	<i>Turdus pilaris</i>	Rússia
RÉPTEIS			
Emydidae	Tartaruga-de-Blanding	<i>Emydoidea blandingii</i>	EUA
	Tartaruga-de-caixa-ornamentada	<i>Terrapene ornata</i>	EUA
	Tartaruga-pintada	<i>Chrysemys picta</i>	EUA
Geoemydidae	Tartaruga-do-telhado	<i>Batagur e Pangshura spp.</i>	Índia
Colubridae	Cobra-rateira-chinesa	<i>Ptyas korros</i>	Índia
	Cobra-de-água-de-colar	<i>Natrix natrix</i>	Índia
Pythonidae	Pitão-indiana	<i>Python molurus</i>	Índia
MAMÍFEROS TERRESTRES			
Bovidae	Camurça-europeia	<i>Rupicapra rubicapra</i>	França
	Íbex	<i>Capra ibex</i>	Suíça
	Carneiro-das-montanhas	<i>Ovis canadensis</i>	EUA
	Gazela-de-Cuvier	<i>Gazella cuvieri</i>	Europa
	Gazela-dama	<i>Nanger dama</i>	EAU; Europa
	Muflão	<i>Ovis orientalis</i>	Chipre; Espanha; República Checa
	Boi-almiscarado	<i>Ovibos moschatus</i>	EUA
	Palanca-negra	<i>Hippotragus niger</i>	Portugal
	Saiga	<i>Saiga tatarica</i>	Cazaquistão
	Cabra-montês	<i>Capra pyrenaica</i>	Espanha
	Cobo-de-água	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	Portugal
	laque	<i>Bos mutus</i>	China
Cervidae	Veado-de-rabo-preto	<i>Odocoileus hemionus colombianus</i>	EUA

	Veado-mula-da-Califórnia	<i>Odocoileus hemionus californicus</i>	EUA
	Gamo	<i>Dama dama</i>	Eslováquia; Espanha; Itália; República Checa
	Veado-vermelho	<i>Cervus elaphus</i>	Espanha; França; Hungria Itália
	Veado-mula-das-Montanhas-Rochosas	<i>Odocoileus hemionus hemionus</i>	EUA
	Corço	<i>Capreolus capreolus</i>	França
	Cervo-sika	<i>Cervus nippon</i>	Japão
	Veado-da-Virginia	<i>Odocoileus virginianus</i>	Canadá; EUA
Suidae	Javali	<i>Sus scrofa</i>	Espanha; República Checa
Leporidae	Lebre-europeia	<i>Lepus europaeus</i>	Chipre; Espanha
	Coelho-europeu	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Austrália; Espanha
	Lebre-japonesa	<i>Lepus brachyurus</i>	Japão
Cricetidae	Campanhol-vermelho	<i>Myodes glareolus</i>	Reino Unido
	Rato-do-chão	<i>Akodon cursor</i>	Brasil
	Rato-do-arroz	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Brasil
	Rato-do-campo-de-rabo-curto	<i>Microtus agrestis</i>	Reino Unido
	Campanhol-boreal	<i>Myodes rutilus</i>	China; Rússia
	Rato-do-brejo	<i>Oxymycterus dasytrichus</i>	Brasil
Muridae	Ratazana-preta	<i>Rattus rattus</i>	Países Baixos
	Ratazana-castanha	<i>Rattus norvegicus</i>	Alemanha; China; Países Baixos; Rússia
	Rato-doméstico	<i>Mus musculus</i>	Brasil; Espanha
	Rato-do-campo	<i>Apodemus</i> spp.	China; Espanha; Itália; Reino Unido; Rússia
Sciuridae	Esquilo-vermelho-americano	<i>Tamiasciurus hudsonicus</i>	Canadá
	Esquilo-voador-do-norte	<i>Glaucomys sabrinus</i>	Canadá
	Tâmia-siberiana	<i>Tamias sibiricus</i>	China; Rússia
Canidae	Coioote	<i>Canis latrans</i>	EUA
	Raposa-vermelha	<i>Vulpes vulpes</i>	Chipre; Espanha; Reino Unido
Erinaceidae	Ouriço-de-Amur	<i>Erinaceus amurensis</i>	China
	Ouriço-da-Argélia	<i>Atelerix algirus</i>	Tunísia
Felidae	Jaguar	<i>Panthera onca</i>	Brasil
	Gato-bravo	<i>Felis silvestris</i>	Espanha
Macropodidae	Canguru-cinzento-ocidental	<i>Macropus fuliginosus</i>	Austrália
Viverridae	Gineta	<i>Genetta genetta</i>	Espanha
MAMÍFEROS MARINHOS			
Mustelidae	Lontra-marinha	<i>Enhydra lutris</i>	EUA
Otariidae	Lobo-marinho-do-Norte	<i>Callorhinus ursinus</i>	EUA
	Leão-marinho-de-Steller	<i>Eumetopias jubatus</i>	EUA
Phocidae	Foca-comum	<i>Phoca vitulina richardsi</i>	EUA

3.2 Vias de transmissão

Os mamíferos infetados por *Coxiella burnetii* excretam a bactéria na urina, fezes, leite, sémen, muco vaginal e produtos de parto, sendo que as membranas fetais destes animais podem apresentar até 10^9 bactérias por grama de tecido.^{1,74,75} Como tal, durante o parto, grandes quantidades de bactérias são libertadas para o ambiente, permanecendo infetantes durante longos períodos de tempo.^{76,77}

Na forma de SDC, a *C. burnetii* torna-se altamente resistente às condições ambientais adversas, podendo permanecer infecciosa por mais de 40 meses até mesmo nas condições mais extremas. Estas partículas, semelhantes a esporos, apresentam a capacidade de sobreviver na lã das ovelhas entre sete a dez meses, a 15-20°C, assim como mais de um mês a 4°C em carne fresca.⁷⁸ No leite, a *C. burnetii* consegue resistir a temperaturas elevadas, sobrevivendo durante 30 minutos a 63°C e 15 segundos a 74°C. No entanto, a sua resistência a temperaturas baixas demonstra-se superior, sendo que *Coxiella burnetii* permanece viável no leite até quase dois anos, a temperaturas de -20°C.²⁴

Nos ruminantes, as principais vias de excreção de *Coxiella burnetii* parecem diferir entre espécies. De um modo geral, as cabras excretam a bactéria principalmente no muco vaginal, fezes e leite, contrastando com as ovelhas, que excretam uma menor quantidade no leite, mas apresentam uma excreção superior a nível das fezes e muco vaginal. No caso das vacas, a excreção de *C. burnetii* parece ocorrer quase exclusivamente pelo leite, seguida das fezes e muco vaginal, em menor expressão.^{79,80}

3.2.1 Via aerógena

A principal via de infeção para humanos e animais é, sem dúvida, a inalação de aerossóis contaminados, geralmente a partir do fluido amniótico e placenta de animais infetados.^{1,21,42}

A transmissão de *C. burnetii* está maioritariamente associada a abortos em ruminantes domésticos, particularmente nos ovinos, com vários autores a reportar uma variação sazonal na incidência de febre Q em humanos, maior na primavera e início do verão, a qual é atribuída ao começo da época de partos e tosquia, com consequente aumento da contaminação ambiental. No entanto, o contacto direto com fêmeas recém abortadas não é estritamente necessário para que ocorra uma infeção em humanos, uma vez que a manipulação de lã, estrume ou roupas contaminadas com fezes de animais infetados pode ser suficiente para que ocorra a transmissão do agente.²² Dada a elevada estabilidade de *Coxiella burnetii* no ambiente, a bactéria é capaz de sobreviver durante várias semanas em áreas onde habitam animais, sendo que a inalação de pó contaminado, resultante da dissecação das fontes primárias, também representa uma possível via de infeção.⁸¹

As carraças, por sua vez, são capazes de excretar grandes quantidades de *C. burnetii* nos seus fluidos corporais e fezes. Estes artrópodes podem libertar até 10^{10} microrganismos por

grama de fezes, cuja inalação, por exemplo, durante o processo de tosquia das ovelhas, representa mais uma via de infecção para os humanos.⁶¹

O vento também representa um importante fator na dispersão da bactéria, sendo capaz de potencializar a sua disseminação a grandes distâncias, tal como reportado num estudo no Reino Unido, onde, após um surto de febre Q, se verificaram casos até cerca de 18 quilómetros da fonte.⁷⁶

3.2.2 Via oral

A ingestão de produtos contaminados com *C. burnetii* tem sido alvo de vários estudos em humanos e animais. No entanto, o seu papel na transmissão da bactéria é um tema controverso e permanece por esclarecer.⁸²⁻⁸⁵

Após a Segunda Guerra Mundial, observou-se um aumento na prevalência de febre Q e seroconversão em populações europeias e norte-americanas, principalmente em regiões onde o consumo de leite cru e produtos derivados eram consumidos com frequência. Como resposta, a pasteurização do leite passou a ser recomendada.^{82,86}

Num estudo realizado em Milwaukee, nos Estados Unidos, de forma a avaliar o papel do leite como via de transmissão em humanos, 34 voluntários procederam à ingestão de leite cru contaminado com *C. burnetii*, sob supervisão, por um período de um mês. Três amostras de soro foram recolhidas de cada um dos participantes, antes de se iniciar a experiência, assim como um e dois meses após o início do estudo, sendo que nenhum dos voluntários desenvolveu sinais clínicos e não foram detetados anticorpos, apesar de terem sido realizados vários tipos de testes laboratoriais.⁸⁴ Estes resultados contrastam com os obtidos num estudo experimental semelhante, também nos Estados Unidos, onde 12% dos 120 participantes testados demonstraram seroconversão após consumo continuado de leite cru contaminado com *C. burnetii*, não se verificando sinais clínicos em nenhum dos intervenientes.⁸⁷ A variação entre os resultados obtidos poderá ser explicada pela diferenças a nível da dosagem e estirpe de *C. burnetii* utilizadas nos dois estudos.⁸⁷ Como tal, tem sido reportado que a presença de sinais clínicos em humanos está maioritariamente associada à inalação de *C. burnetii*, sendo que a ingestão de produtos contaminados poderá resultar em seroconversão, revelando evidências de infecção, mas não necessariamente no desenvolvimento de um quadro clínico. Adicionalmente, a seroconversão aparenta resultar, não só da ingestão de bactérias viáveis, como também de bactérias inativadas.⁸²

Em explorações de vacas leiteiras foi demonstrado que os vitelos podem infetar-se por ingestão de leite contaminado, eliminando conseqüentemente *C. burnetii* na urina e nas fezes, o que contribui para o aumento da contaminação ambiental. Adicionalmente, a ingestão de placentas e outros produtos de parto, assim como comportamentos predatórios sobre outros animais infetados, constitui um risco acrescido para carnívoros domésticos e selvagens, uma vez que poderá ser suficiente para que se estabeleça uma infecção. É, portanto, aconselhada a

destruição destes produtos, de modo a minimizar a disseminação de *Coxiella burnetii* no ambiente.^{43,88}

3.2.3 Via transcutânea

Como referido anteriormente, a transmissão de *C. burnetii* por meio de artrópodes tem sido reportada, nomeadamente em carraças dos Géneros *Ixodes*, *Dermacentor* e *Hyalomma*.⁷⁸ Em carraças infetadas em laboratório, foi detetada a presença de *Coxiella burnetii* no seu intestino médio, hemolinfa, túbulos de *Malpighi*, glândulas salivares e ovários. Dada a natureza hematófaga destes artrópodes, a transmissão de *C. burnetii* a animais e humanos poderá ocorrer pela saliva, no momento da sua alimentação.⁶¹

Em humanos, vários estudos indicam que a transmissão de *C. burnetii* após a picada de carraças infetadas é possível, ainda que muito rara.^{78,89,90} Na Polónia, um estudo, realizado numa região onde a incidência anual de doenças associadas a carraças se revela 16 a 28 vezes superior às restantes regiões do país, demonstrou que, apesar do DNA de *C. burnetii* não ter sido detetado em nenhum dos 540 participantes por *Polymerase chain reaction* (PCR) convencional, foram detetados anticorpos anti-*C. burnetii* em 11 elementos, os quais apresentavam historial de contacto frequente com carraças. Isto permitiu concluir que, para humanos, mesmo em áreas onde as doenças associadas a carraças são endémicas, o risco de desenvolver febre Q por esta via é baixo.⁹¹

Como tal, apesar de algumas espécies de carraças demonstrarem a capacidade de infetar vertebrados e humanos, esta parece ser limitada, o que indica que a via transcutânea desempenha um papel de menor importância na transmissão de *C. burnetii*, quando comparada com a via aerógena.⁶¹

3.2.4 Via sexual

A possibilidade da via sexual desempenhar um papel na transmissão de *C. burnetii* foi considerada há mais de 70 anos.⁹² Hoje, sabe-se que, de facto, a transmissão sexual de febre Q entre mamíferos, incluindo os humanos, é possível.^{42,93-95}

Na Polónia, foi realizado um estudo envolvendo nove homens previamente empregados como pastores durante a época de partos de ovelhas em Espanha. Estes encontravam-se separados das respetivas esposas e, após o seu retorno, foi diagnosticada febre Q em todos os casais, procedendo-se então à recolha de soro de todos os envolvidos, incluindo os restantes membros de família que habitavam no mesmo espaço. A presença de *C. burnetii* no sémen dos pacientes infetados, assim como a deteção de anticorpos contra antígenos de fase I e fase II em alguns dos pacientes e respetivas esposas, mas não em qualquer membro da família, permitiu assim excluir a inalação de partículas contaminadas e concluir que a via sexual seria a causa de infeção mais provável.⁹⁶

No entanto, ainda que a presença de *C. burnetii* no sêmen de pacientes seja demonstrada, não se deve excluir o envolvimento de outros fluídos durante o coito, como saliva, sangue e urina, que podem ser os verdadeiros veículos para que se estabeleça a infecção.⁹⁵

Como referido anteriormente, a transmissão de *Coxiella burnetii* pela via sexual nos animais é possível, tendo sido alvo de estudo e demonstrada em ratos.⁹⁷ Nos bovinos, esta via também poderá possibilitar uma infecção, uma vez que já foi reportada a presença de *C. burnetii* no sêmen de touros.⁹⁸

3.2.5 Transmissão inter-humana

A transmissão de febre Q entre humanos é possível mas é considerada um acontecimento raro.⁴² Para além da via sexual, estão descritos casos esporádicos de transmissão entre humanos pela via transplacentária, resultando em infeções congénitas, por inoculações intradérmicas, por ingestão de leite materno infetado e ainda em transplantes de medula óssea e transfusões de sangue.^{1,99–102} Um caso envolvendo duas pacientes grávidas hospitalizadas, as quais partilhavam o mesmo espaço e utilizavam a mesma casa de banho, demonstrou que a transmissão de *C. burnetii* da paciente infetada para a saudável poderá ter ocorrido pela transferência de partículas infecciosas aerossolizadas, provenientes de produtos placentários excretados por via vaginal.⁹⁹ A transmissão de febre Q no decorrer de autópsias realizadas em cadáveres infetados também se encontra descrita.^{42,103}

Na Figura 7 encontram-se então descritas, não só as vias de transmissão entre humanos, como as vias de transmissão de *Coxiella burnetii* a nível dos ciclos domésticos e selvagens.

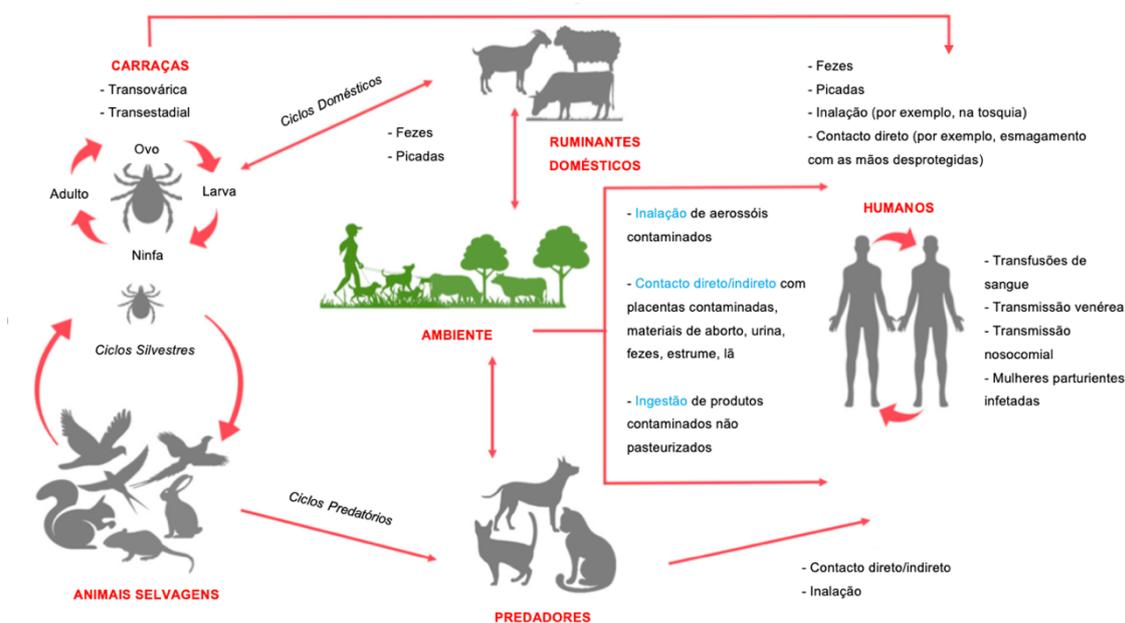


Figura 7 - Vias de transmissão de *Coxiella burnetii*. (Adaptado de ⁴³)

3.3 Fatores de risco

A febre Q é reconhecida como um perigo de caráter ocupacional para indivíduos que trabalham com animais ou produtos de origem animal. A exposição ocupacional representa o fator de risco mais comum em vários estudos relativos a infecções nos humanos, ocorrendo principalmente em comunidades agrícolas.¹⁰⁴ Entre os grupos de risco mais elevado destacam-se pastores, produtores e técnicos agrícolas, médicos veterinários e estudantes de medicina veterinária, cujo contacto com ruminantes e outros animais se revela muito frequente.¹⁰⁵ Trabalhadores associados a matadouros, transporte de gado e curtume também apresentam um risco mais elevado, quando comparados com a população geral.¹⁰⁶ Este risco é ainda exacerbado pelo desconhecimento da doença, nomeadamente em indivíduos com as ocupações previamente referidas, uma vez que torna improvável a instituição de medidas de proteção, de forma a prevenir ou minimizar a incidência de infecções.¹⁰⁷

Ainda que o papel dos porcos na epidemiologia da febre Q não seja muito claro, o contacto com estes animais, assim como ratos, ratazanas, aves domésticas e selvagens, também é considerado um fator de risco.¹⁰⁸ No entanto, também estão descritos surtos em comunidades onde o contacto direto com animais não foi comprovado.¹⁰⁹

Apesar da febre Q ocorrer em qualquer faixa etária, é mais prevalente em indivíduos entre os 30 e os 70 anos de idade.⁷⁴ Segundo dados da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) de 2009, a taxa de notificação mais elevada de casos humanos de febre Q na Europa dizia respeito à faixa etária dos 45 aos 64 anos, seguida dos grupos dos 25 aos 44 anos e mais de 65 anos. Ainda que já tenham sido reportados casos em crianças, a ocorrência de febre Q em indivíduos com menos de 15 anos de idade é rara. A taxa de infecção também aparenta ser maior em indivíduos do sexo masculino, quando comparados com indivíduos do sexo feminino, com um rácio próximo de 2:1.¹¹⁰ No entanto, esta proporção varia de região para região, sendo que a explicação para a ocorrência de maior número de casos em homens poderá assentar no facto destes estarem envolvidos com mais frequência em atividades agrícolas. No entanto, mesmo em regiões em que o risco de desenvolver febre Q é semelhante para ambos os sexos, os sintomas parecem ser mais severos em indivíduos do sexo masculino.¹ Um estudo realizado em ratos demonstrou que, após infecção experimental, os machos apresentavam uma concentração de bactérias superior, quando comparados com as fêmeas, sugerindo que as hormonas sexuais poderiam desempenhar um papel no controlo da infecção por *C. burnetii*. Isto foi comprovado após comparação das concentrações bacterianas entre fêmeas ovariectomizadas e fêmeas não castradas, verificando-se que as primeiras apresentavam valores superiores e uma maior taxa de formação de granulomas. Foi então possível concluir que os estrogénios têm um papel importante na infecção de *C. burnetii*, nomeadamente na resposta inflamatória induzida pela bactéria, limitando tanto a infecção dos tecidos como a formação de granulomas. Estas descobertas poderão ser a explicação para a maior severidade dos sinais clínicos verificados em indivíduos do sexo masculino.¹¹¹

O consumo de leite e seus derivados é raramente identificado como um fator de risco em investigações epidemiológicas relativas a surtos de febre Q. O número de bactérias excretadas no leite não é muito elevado, principalmente em vacas naturalmente infetadas, uma vez que a excreção é realizada de forma intermitente. Em ovelhas infetadas experimentalmente, o número de microrganismos excretados no leite revelou-se 100 a 1000 inferior ao número de bactérias excretadas no muco vaginal.⁸⁸ Adicionalmente, *C. burnetii* é incapaz de se multiplicar no leite, uma vez que, sendo uma bactéria intracelular obrigatória, necessita de uma célula hospedeira eucariótica. Assume-se, portanto, que a multiplicação da bactéria não ocorre no leite e nos seus derivados.¹¹²

As infeções em indivíduos HIV positivos são geralmente mais severas e frequentes comparativamente à população saudável. Devido às suas deficientes defesas imunológicas, todos os anos são encontrados novos agentes etiológicos oportunistas capazes de causar infeção. Algumas zoonoses, como é o caso da febre Q, aparentam ser mais frequentes em hospedeiros imunodeprimidos, sendo o risco de transmissão mais elevado em indivíduos HIV positivos do que na população geral.¹¹³ As mulheres grávidas também apresentam um risco mais elevado de desenvolver febre Q crónica, após infeção aguda, sendo que este mecanismo pode ser explicado pela imunossupressão associada à gestação.¹¹⁴

O tabagismo também representa um fator de risco, uma vez que fumar prejudica a capacidade de defesa pulmonar do hospedeiro. O toque no cigarro com mãos contaminadas por *C. burnetii*, nomeadamente em situações de más práticas de higiene, pode levar à sua ingestão e conseqüente infeção, com uma maior probabilidade de desenvolver um quadro clínico.^{115,116}

Relativamente às populações animais, efetivos com grande número de animais podem representar um risco acrescido pela maior probabilidade de introduzir *C. burnetii* no ambiente.^{108,117-119} Um estudo realizado na Dinamarca com amostras de leite de tanque (BTM) de 120 explorações permitiu concluir que efetivos com mais de 150 vacas são aproximadamente 18 vezes mais prováveis de apresentarem seropositividade, quando comparados com efetivos com menos de 80 vacas.¹¹⁹ A densidade animal representa outro fator importante, sendo que efetivos localizados em áreas com 100 a 120 vacas por km² encontram-se em maior risco de desenvolver febre Q, quando comparados com efetivos em áreas com uma densidade inferior a 60 vacas por km². Isto permite demonstrar a elevada capacidade de propagação de *C. burnetii* entre explorações vizinhas, em grande parte através do vento.¹²⁰

Vários estudos implicam o vento como um importante fator epidemiológico na disseminação de *C. burnetii* a partir de explorações agrícolas e matadouros. Como foi referido anteriormente, a bactéria pode ser transportada até 18 km pelo vento, sendo que, no entanto, em áreas rurais, o risco de infeção é mais elevado até 5 km da fonte, a partir dos quais é considerado baixo.^{121,122} Os surtos urbanos, por sua vez, parecem ocorrer em distâncias menores, com maior risco para áreas num raio de 2 a 4 km da fonte do microrganismo. As razões para estas inconsistências incluem fatores que modulam a dispersão geográfica da bactéria, como velocidade do vento e presença de barreiras físicas, nomeadamente vegetação.¹²¹ Em adição ao vento natural, dois estudos relativos a um surto em França reportaram que transmissão

aerógena de *C. burnetii* observada a partir de material resultante do abate de cabras e ovelhas, teve como causa mais provável a existência de um heliporto próximo da área afetada, cujas operações geravam um grande número de partículas aerossolizadas.^{121,123} A fertilização dos campos com estrume contaminado, principalmente em dias mais ventosos, também tem sido implicado como um fator de risco para surtos humanos, uma vez que possibilita a aerossolização de *Coxiella burnetii*.¹²⁴ Para além do vento, outros fatores climáticos, como a temperatura e precipitação, também têm implicações na epidemiologia de *C. burnetii*. Temperaturas mais elevadas, assim como baixos níveis de precipitação, contribuem para uma maior quantidade de pó no ar, refletindo-se numa maior probabilidade de transmissão da bactéria.¹²⁵

A movimentação de animais entre explorações é um importante fator de risco no que diz respeito a várias doenças infecciosas.^{126–128} Este é o caso para a febre Q, sendo que a disseminação de *C. burnetii* para explorações seronegativas poderá ocorrer pela introdução de novos animais, provenientes de efetivos infetados. Por sua vez, quanto maior for o número de explorações das quais os novos animais são originários, maior o risco de infeção para a exploração onde são introduzidos.¹²⁰ Adicionalmente, a falta de quarentena de animais recém chegados à exploração também está associada a um maior risco de infeção.¹¹⁸

Os médicos veterinários e os técnicos agrícolas também poderão estar implicados na transmissão de *Coxiella burnetii* entre explorações, através de roupa e calçado contaminados. Num estudo com 24 efetivos de vacas leiteiras, a seropositividade revelou ser mais baixa em situações onde se verificavam boas práticas de higiene, como a lavagem das mãos e troca de vestuário antes da entrada na exploração.¹¹⁸

3.4 Prevalência da doença

3.4.1 Prevalência da febre Q em humanos

Segundo o Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (CEPCD), e tal como consta no seu relatório epidemiológico anual de 2019, foram reportados, nesse mesmo ano, 1069 casos de febre Q em humanos nos 23 países pertencentes à UE e/ou ao Espaço Económico Europeu (EEE). Dos 1069 casos, 958 (90%) foram confirmados, como é possível observar na Tabela 2. Nesta tabela constam os dados relativos ao número de casos confirmados totais, assim como o número de notificações por 100 000 habitantes, para cada país, no período de 2015 a 2019. Na Figura 8, é possível visualizar a distribuição dos casos em cada um dos referidos países.

Tal como observado em anos anteriores, a Alemanha, Espanha e França lideram o grupo de países com maior número de casos confirmados de febre Q, no ano de 2019. No entanto, seis países reportaram zero casos confirmados, comparativamente a nove países em 2018, dez em 2017 e nove em 2016.

Em média, o número de notificações por 100 000 habitantes na UE/EEE correspondeu a 0,2 em 2019, tal como se verificou nos quatro anos anteriores. Os países com maior número

de notificações por 100 000 habitantes incluem Espanha (0,7), Roménia (0,6), Bulgária (0,5) e Hungria (0,5).¹²⁹

Tabela 2 - Distribuição do número casos confirmados de febre Q (C) e número de notificações por cada 100 000 habitantes (T), por país pertencente à UE e/ou EEE e por ano, no período de 2015 a 2019. .: não foram reportados dados; -: não foi calculada a taxa de notificação¹²⁹

País	2019		2018		2017		2016		2015	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Alemanha	148	0,2	90	0,1	107	0,1	270	0,3	310	0,4
Áustria
Bélgica	10	0,1	6	0,1	7	0,1	16	0,1	8	0,1
Bulgária	36	0,5	45	0,6	28	0,4	17	0,2	15	0,2
Chipre	1	0,1	0	0,0	3	0,4	2	0,2	4	0,5
Croácia	8	0,2	11	0,3	23	0,6	8	0,2	14	0,3
Dinamarca	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Eslováquia	1	0,0	2	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Eslovénia	6	0,3	1	0,0	3	0,1	1	0,0	1	0,0
Espanha	332	0,7	313	0,7	333	0,7	249	0,5	97	-
Estónia	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0,0	0,0
Finlândia	2	0,0	2	0,0	4	0,1	2	0,0	3	0,1
França	155	0,2	172	0,3	194	0,3	251	0,4	250	0,4
Grécia	14	0,1	13	0,1	4	0,0	9	0,1	10	0,1
Hungria	47	0,5	28	0,3	29	0,3	39	0,4	35	0,4
Irlanda	2	0,0	0	0,0	2	0,0	6	0,1	4	0,1
Islândia	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Itália	6	0,0	1	0,0	7	0,0	3	0,0	-	-
Letónia	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,1
Lituânia	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Luxemburgo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,2
Malta	1	0,2	2	0,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Noruega	8	0,2	5	0,1	4	0,1	2	0,0	1	0,0
Países Baixos	16	0,1	18	0,1	22	0,1	14	0,1	20	0,1
Polónia	4	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Portugal	32	0,3	36	0,3	48	0,5	17	0,2	20	0,2
Reino Unido	9	0,0	19	0,0	21	0,0	34	0,1	21	0,0
República Checa	1	0,0	1	0,0	0	0,0	2	0,0	1	0,0
Roménia	109	0,6	22	0,1	46	0,2	32	0,2	3	0,0
Suécia	10	0,1	7	0,1	1	0,0	3	0,0	4	0,0
TOTAL	958	0,2	794	0,2	886	0,2	977	0,2	823	0,2



Figura 8 - Distribuição dos casos confirmados de febre Q por país pertencente à UE e/ou EEE em 2019¹²⁹

Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE) e o Portal da Transparência (PT), foram reportados 38 casos confirmados de febre Q na Região Norte de Portugal entre 2009 e 2018, dos quais 26 se verificaram na Área Metropolitana do Porto (AMP).^{130,131} A distribuição dos casos em cada ano encontra-se representada na Tabela 3.

Tabela 3 - Casos confirmados de febre Q na Região Norte de Portugal e na Área Metropolitana do Porto, entre 2009 e 2018^{130,131}

Região	2018	2017	2016	2015	2014	2013	2012	2011	2010	2009	Total
Norte	7	8	3	8	5	2	2	0	1	2	38
AMP	6	6	0	8	2	1	0	0	1	2	26

No concelho de Vila do Conde, onde se realizou o presente estudo, foram verificados quatro casos entre 2014 e 2022, tal como verificado no concelho vizinho de Póvoa de Varzim, com a sua distribuição anual demonstrada na Tabela 4.¹³²

Tabela 4 - Casos confirmados de febre Q nos concelhos de Póvoa de Varzim e Vila do Conde, entre 2014 e 2022¹³²

Concelho	2022	2021	2020	2019	2018	2017	2016	2015	2014	Total
Póvoa de Varzim	1	0	0	1	0	2	0	0	0	4
Vila do Conde	2	0	0	1	0	0	0	0	1	4

Fora da Europa, países como Austrália, China, EUA e Índia também têm vindo a realizar cada vez mais estudos relativos à prevalência de febre Q em humanos.^{133–137}

No caso da Austrália, foram reportados, em média, 517 casos por ano, entre 2013 e 2018, correspondendo a uma taxa de notificação de 2,1 por cada 100 000 habitantes. Um estudo utilizando soro sanguíneo de 2785 participantes demonstrou uma seroprevalência de 5,6 %, sem grandes diferenças entre áreas metropolitanas e áreas rurais. Extrapolando estes resultados, com uma população de 23,4 milhões de habitantes, estima-se que 1,3 milhões de pessoas possam ter sido expostos a *Coxiella burnetii* neste país.¹³³

Entre 2003 e 2004, num estudo realizado nos EUA, foram recolhidas amostras de soro de 4437 participantes com 20 ou mais anos de idade para pesquisa de anticorpos anti-*C. burnetii*, das quais 180 se revelaram positivas. Isto revela uma seroprevalência de 3,1%, estimando-se que 6,1 milhões de habitantes nesta faixa etária apresentem anticorpos para o agente etiológico de febre Q.¹³⁵

Na China, uma revisão sistemática de 29 estudos publicados entre 1989 e 2013, relativos a febre Q neste país, demonstrou uma prevalência média de 10% em humanos, com 1139 indivíduos a demonstrarem evidências de infeção, numa amostra total de 11209 pessoas localizadas em 64 cidades de 19 províncias diferentes.¹³⁴

Relativamente à Índia, têm sido realizados vários estudos de serovigilância, nomeadamente na cidade de Deli e nos estados de Uttar Pradesh e Rajastão, utilizando testes de fixação do complemento (CFT), testes de microaglutinação (MAT) e testes de aglutinação capilar (CAT). Os valores de seroprevalência de febre Q em humanos, nestas regiões, variaram entre 5% e 25,5%, sendo que a sua significância pode ter sido comprometida devido à observação de reações cruzadas e baixa sensibilidade de alguns testes laboratoriais realizados. No entanto, dados epidemiológicos indicam que a presença de *Coxiella burnetii* no subcontinente indiano tem vindo a aumentar, tanto em humanos como nos animais.¹³⁶

Recentemente, foi publicada uma revisão sistemática de 88 estudos relativos a febre Q efetuados em 24 países africanos, entre 2000 e 2022. Foram realizados vários estudos serológicos em África do Sul, Argélia, Egito, Etiópia, Gâmbia, Namíbia, Nigéria, Quênia, São Tomé, Sudão do Sul e Tanzânia, nos quais se observou uma seroprevalência média de 16% numa amostra de 13178 participantes. Por sua vez, os estudos que utilizaram métodos moleculares de diagnóstico, efetuados no Egito, Mali, Quênia, Senegal e Tanzânia, permitiram, em média, detetar a presença de *C. burnetii* em 3% da amostra, sendo esta composta por 1646 indivíduos.¹³⁸

Na Tabela 5, encontram-se agrupados alguns dos estudos serológicos realizados em vários países do mundo.

Tabela 5 - Valores de seroprevalência de anticorpos anti-*C. burnetii* obtidos em vários estudos com populações de diferentes países. *: Este estudo foi realizado na Região Centro de Portugal, contando com a participação de 96 pastores e produtores de queijo de ovinos Serra da Estrela, assim como 260 voluntários da mesma região, que constituíram o grupo de controlo. As seroprevalências observadas no grupo de pastores/produtores e no grupo de controlo corresponderam a 28,1% e 8,1%, respetivamente; **: Este estudo foi realizado em pacientes hospitalizados, onde foram formados dois grupos distintos. O primeiro grupo foi constituído por 111 pacientes hospitalizados devido a acidentes vasculares cerebrais e/ou ataques isquémicos transitórios, sendo o segundo grupo composto por 523 controlos, os quais não apresentavam este quadro clínico. A seroprevalência observada no grupo de casos e no grupo de controlos foi de 14,5 e 6,1, respetivamente; CR: Comunidades rurais; ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; IFA: Indirect Fluorescent Antibody Assay; ND: Não definido; PG: População Geral; PH: Pacientes hospitalizados; PPQ: Pastores e produtores de queijo de ovinos; R: Referência bibliográfica; TL: Técnica Laboratorial; \bar{x} : Média

País	Ano	Contexto	Amostra	Idades (anos)	TL	Seroprevalência (%)	R
Quênia	2019	CR	1299	0-47	ELISA	13,2	139
Portugal*	2017	PPQ	96+260	\bar{x} = 57	ELISA	28,1 e 8,1	140
Guiana Francesa	2017	PG	2697	2-75	IFA; ELISA	9,6	141
Austrália	2012-13	PG	2785	1-79	IFA	5,6	133
Espanha**	2011-12	PH	111+523	≥ 65	IFA	14,5 e 6,1	142
Ilha da Reunião	2009	PG	241	ND	IFA	6,8	143
Países Baixos	2006-07	PG	5654	0-79	IFA; ELISA	2,4	144
EUA	2003-04	PG	4437	≥ 20	IFA; ELISA	3,1	135
Irlanda do Norte	1987	PG	2394	12-64	ELISA	12,8	145

3.4.2 Prevalência de febre Q nos ruminantes domésticos

No que diz respeito à febre Q, e tal como anteriormente referido, os ruminantes domésticos constituem a principal fonte de infeção para os humanos. Como tal, a partir de 1990, foi possível observar um número crescente de estudos relativos à prevalência de *C. burnetii* em bovinos, ovinos e caprinos, distribuídos pelos cinco continentes.¹⁴⁶

Em Ontário, Canadá, entre 2010 e 2012, foram recolhidas 2363 amostras de soro de ovelhas, distribuídas por 72 explorações, e submetidas a testes de ELISA, revelando uma seroprevalência média de 14,7% a nível animal, sendo esta mais alta em ovelhas leiteiras (24,3%) comparativamente a ovelhas de carne (10,2%). No que diz respeito às explorações, 48,6% demonstrou pelo menos um animal seropositivo.¹⁴⁷ Noutro estudo, realizado entre 2010 e 2011, no Estado de Washington, EUA, foram recolhidas amostras de soro de 1794 cabras leiteiras, pertencentes a 104 explorações de 31 condados diferentes, obtendo-se uma seroprevalência de 8% a nível animal e 8,6% a nível de exploração.¹⁴⁸ Já no Estado de Alagoas,

Brasil, um estudo conduzido entre 2014 e 2015, com amostras de soro de 312 cabras leiteiras com historial de problemas reprodutivos, revelou uma seroprevalência de 55,1%. Foram ainda recolhidas amostras de cotilédones de 23 placentas e posteriormente submetidas a testes de PCR, revelando uma prevalência molecular de 8,7%.¹⁴⁹

Na Ásia e Oceânia, países como a China, Índia e Austrália também apresentam estudos relativos à prevalência de febre Q nos ruminantes domésticos. Entre 2014 e 2015, foram recolhidas amostras de sangue de 1157 caprinos oriundos de seis condados da província de Hubei, China, e submetidas a testes de ELISA. Todos os condados apresentaram casos positivos, sendo que a seroprevalência média obtida foi de 4,8% (1,1-11,8%).¹⁵⁰ Em Bareli, Índia, foram recolhidas amostras de sangue e leite de 224 bovinos leiteiros, entre 2015 e 2016, obtendo-se uma seroprevalência de 29,9% no soro e 26,7% no leite. Adicionalmente, foram ainda realizados esfregaços vaginais, e submetidas todas as amostras a testes de PCR, detetando-se a presença de *C. burnetii* em 12,9% das amostras de soro, 5,5% das amostras de leite e 14,7% dos esfregaços vaginais.¹⁵¹ No que diz respeito à Austrália, foi realizado um estudo, entre 2018 e 2019, no qual participaram 49 das 66 explorações de caprinos leiteiros licenciadas pelas respetivas entidades estatais para venda de leite e/ou seus derivados neste país, com uma média de 782 animais por exploração. Foram recolhidas amostras de BTM de cada uma das explorações e conseqüentemente submetidas a testes de ELISA e PCR, obtendo-se três explorações positivas a ambos os testes e duas apenas positivas nos testes de ELISA. Estes resultados traduziram-se numa prevalência aparente de 10% e uma prevalência verdadeira estimada de 3%.¹⁵²

Relativamente ao continente africano, um estudo realizado nos Camarões, em 2000, contando com uma amostra de 1377 bovinos de 146 explorações, demonstrou uma seroprevalência de 39% a nível animal e 68% a nível de exploração.¹⁵³ Entre 2017 e 2019, em várias regiões da Guiné, foram recolhidas 1357 amostras de sangue de 436 bovinos, 486 ovinos e 408 caprinos, revelando uma seroprevalência de 20,5%, 2,3% e 4,4%, respetivamente.¹⁵⁴ Por sua vez, na província de Limpopo, África do Sul, foram recolhidas amostras de sangue e fluido vaginal de 383 bovinos, entre 2020 e 2021, evidenciando uma seroprevalência de 24,3% e uma prevalência molecular de 15,7%.¹⁵⁵

Na Europa, vários países também já realizaram estudos relativos à prevalência de *C. burnetii* nas suas regiões.¹⁵⁶ Em França, entre 2012 e 2015, foi efetuado um estudo com uma grande população animal, contando com 10040 bovinos, 7776 ovinos e 5249 caprinos, pertencentes a 731, 522 e 349 explorações, respetivamente. Para cada exploração, foi recolhido um número significativo de amostras de sangue, destinadas a testes de ELISA, o que se traduziu numa seroprevalência a nível animal de 22,2% em bovinos, 25,7% em ovinos e 41,5% em caprinos. Por sua vez, 36%, 55,7% e 61% das explorações de bovinos, ovinos e caprinos demonstraram seropositividade, respetivamente, sendo esta notoriamente mais elevada em explorações leiteiras.¹⁵⁷ Comparativamente, outro estudo realizado entre 2015 e 2018, nas Astúrias, Espanha, contando com amostras de sangue de 163 bovinos, 154 ovinos e 135 caprinos, revelou uma seroprevalência a nível animal de 18,4%, 8,4% e 24,4%,

respetivamente.¹⁵⁸ Entre 2015 e 2019, na Grécia, um estudo novamente realizado com estas três espécies, contando com amostras de sangue de 1173 ovinos e caprinos de 177 explorações diferentes, assim como 28 bovinos de cinco explorações, evidenciou uma seroprevalência de 17% a nível animal para os ovinos e caprinos, e de 21% no caso dos bovinos. A nível de exploração, foi obtida numa seroprevalência de 44% nas explorações de ovinos e caprinos, assim como 40% nas explorações de bovinos. Neste estudo, não foi possível obter valores independentes no caso dos pequenos ruminantes, uma vez que o pastoreio de efetivos mistos é uma prática muito comum neste país.¹⁵⁹

Na Tabela 6, encontram-se descritos alguns dos estudos desenvolvidos por países europeus, relativos à prevalência molecular e serológica de *Coxiella burnetii* nos ruminantes domésticos.

Tabela 6 – Prevalência molecular e serológica de *Coxiella burnetii* nos ruminantes domésticos, obtida em vários estudos realizados por países europeus. R: Referência Bibliográfica; TL: Técnica Laboratorial

País	Ano	Espécie	Tamanho da amostra		% Positivo		TL	R
			Animais	Explorações	Animais	Explorações		
Albânia	1999	Bovinos	552	-	8,5	-	ELISA	156
		Ovinos	292	-	12,3	-	ELISA	156
		Caprinos	260	-	4,2	-	ELISA	156
Alemanha	1998	Bovinos	21191	-	7,8	-	ELISA	156
		Ovinos	1346	-	1,3	-	ELISA	156
		Caprinos	278	-	2,5	-	ELISA	156
Áustria	-	Ovinos	-	70	-	2,9	CFT	156
		Caprinos	-	30	-	16,7	CFT	156
Bélgica	2006	Bovinos	-	50	-	30,0	PCR	160
Bulgária	2002-06	Bovinos	15866	-	8,5	-	CFT	156
		Ovinos	8727	-	11,6	-	CFT	156
		Caprinos	3928	-	13,7	-	CFT	156
Chipre	-	Bovinos	75	-	24,0	-	IFA	156
		Ovinos	481	-	18,9	-	IFA	156
		Caprinos	417	-	48,2	-	IFA	156
Dinamarca	2003	Bovinos	164	-	18,0	-	ELISA	156
	2004	Bovinos	80	-	35,0	-	ELISA	156
	2006	Bovinos	266	-	25,0	-	ELISA	156
Eslováquia	2000	Ovinos	269	-	37,2	-	ELISA	156
	2009	Ovinos	269	-	58,4	-	ELISA	156
Espanha	2005	Ovinos	1011	34	8,9	67,6	ELISA	156
	2007-08	Bovinos	626	46	6,7	43,0	ELISA	156
		Ovinos	1379	42	11,8	74,0	ELISA	156

		Caprinos	115	11	8,7	45,0	ELISA	156
	2009-10	Bovinos	1306	-	12,3	-	ELISA	156
		Bovinos	-	178	-	51,7	PCR	161
	2015-18	Bovinos	163	-	18,4	-	ELISA	158
		Ovinos	154	-	8,4	-	ELISA	158
		Caprinos	135	-	24,4	-	ELISA	158
França	2006	Caprinos	359	14	36,0	92,9	ELISA	156
	2008	Caprinos	1057	28	32,0	85,7	ELISA	156
	2012-15	Bovinos	10040	731	22,2	36,0	ELISA	157
		Ovinos	7776	522	25,7	55,7	ELISA	157
		Caprinos	5249	349	41,5	61,0	ELISA	157
Grécia	-	Ovinos	554	-	10,5	-	IFA	156
		Caprinos	61	-	6,6	-	IFA	156
	2015-19	Bovinos	28	5	21,0	40,0	ELISA	159
		Ovinos	1173	177	17,0	44,0	ELISA	159
		Caprinos						
Irlanda do Norte	2009	Bovinos	5182	273	6,2	48,4	ELISA	156
	-	Ovinos	1022	58	12,3	62,1	IFA	156
		Caprinos	54	7	9,3	42,9	IFA	156
Itália	1999-02	Ovinos	-	675	-	38,0	ELISA	156
	2011	Bovinos	-	287	-	60,3	PCR	162
	2012	Ovinos	2553	111	15,5	38,7	ELISA	156
		Caprinos	3185	206	16,2	19,5	ELISA	156
	2014-18	Bovinos	6180	402	13,0	35,0	ELISA	163
Letónia	2015	Bovinos	-	252	-	10,7	PCR	164
Montenegro	-	Ovinos	954	-	5,0	-	MAT; IFA	156
Países Baixos	1987	Ovinos	3603	191	3,5	27,2	ELISA	156
		Caprinos	594	-	1,0	-	ELISA	156
	2007	Bovinos	-	341	-	56,6	PCR	165
	2008	Bovinos	2936	-	16,0	-	ELISA	156
	2008	Ovinos	12052	1208	2,4	14,5	ELISA	166
		Caprinos	3134	442	7,8	17,9	ELISA	166
	2009-11	Bovinos	-	301	-	81,6	ELISA	167
18,8						PCR	167	
Polónia	-	Caprinos	98	-	79,6	-	MAT	156
	2011-12	Bovinos	169	-	11,8	-	ELISA	156
		Bovinos	169	-	10,7	-	CFT	156
Reino Unido	-	Caprinos	5791	384	0,9	10,2	ELISA	156
	2014-15	Bovinos	-	220	-	25,9	PCR	168

República da Irlanda	2005-08	Ovinos	2197	119	0,7	8,4	ELISA	¹⁶⁹
		Caprinos	590	66	0,3	1,5	ELISA	¹⁶⁹
Suíça	2011	Ovinos	500	100	1,8	5,0	ELISA	¹⁵⁶
		Caprinos	321	72	3,4	11,1	ELISA	¹⁵⁶

Na última década, em Portugal, foram realizados vários estudos relativos à coxielose nos ruminantes domésticos em diversas regiões, permitindo obter-se um maior conhecimento da prevalência de *Coxiella burnetii* em território nacional (Tabela 7).

Entre 2009 e 2013, na Região Centro, foram recolhidas amostras de BTM de 109 explorações de ruminantes, com um total de 9337 animais, contando com 45 explorações de bovinos e 64 explorações de pequenos ruminantes, das quais 39 de ovinos, 13 de caprinos e 12 mistas. As amostras foram então submetidas a testes de ELISA e PCR, evidenciando uma seroprevalência média a nível de exploração de 45,9%, correspondendo a 37,8% nas explorações de bovinos, 51,3% em ovinos, 46,2% em caprinos e 58,3% nas explorações mistas. A prevalência molecular média de *C. burnetii* foi de 11,9%, com 20% das explorações de bovinos, 5,1% das explorações de ovinos, 0% das explorações de caprinos e 16,7% das explorações mistas a demonstrarem evidências de infeção ativa.¹⁷⁰

Novamente na Região Centro, em 2011, foram recolhidas amostras de sangue de 460 animais de 89 explorações de pequenos ruminantes, contabilizando 24 explorações de ovinos, 52 de caprinos e 13 mistas. A seroprevalência média a nível de exploração correspondeu a 37,5% para ovinos, 28,8% para caprinos e 38,5% para as explorações mistas. Por sua vez, observou-se uma seroprevalência a nível animal de 8,6% nos ovinos e 10,4% em caprinos.¹⁷¹

No município de Barcelos, em 2013, foram recolhidas amostras de BTM de 90 explorações de bovinos, com um total de 9610 vacas lactantes, e posteriormente submetidas a testes serológicos, observando-se uma seroprevalência aparente de 61,1%. No ano seguinte, um novo estudo, na mesma região e novamente com bovinos leiteiros, evidenciou uma seroprevalência a nível de exploração de 62%, após análise serológica de amostras de BTM de 50 explorações com um total de 6050 animais lactantes.¹⁷²

Em 2015 e 2016, num estudo serológico longitudinal, foram analisadas duas amostras de BTM de 78 explorações de ovinos da Serra da Estrela, recolhidas com um ano de intervalo, evidenciando uma seroprevalência de 10,2% em 2015 e 25,6% no ano de 2016.¹⁷³ Seguindo o mesmo princípio, noutra exploração, realizado na mesma região e período, foram realizadas duas colheitas de sangue de 168 ovinos Serra da Estrela, com um ano de intervalo, revelando uma seroprevalência de 7,7% em 2015 e 17,3% em 2016.¹⁷⁴ Ambos os estudos demonstraram um aumento da seroprevalência a nível animal e de exploração em ovinos, de 2015 para 2016, sugerindo que a febre Q é uma doença emergente na Região Centro de Portugal.^{173,174}

Em 2018, na Ilha Terceira, Açores, num estudo no âmbito de uma dissertação de mestrado, foram recolhidas amostras de BTM de 132 explorações de bovinos leiteiros, de um total de 544 explorações, demonstrando uma seroprevalência aparente de 75,8% nesta região.¹⁷⁵

Tabela 7 - Prevalência molecular e serológica de *Coxiella burnetii* em ruminantes domésticos, obtida em vários estudos realizados em Portugal. BOV: Bovinos; CAP: Caprinos; OV: Ovinos; PR: Explorações mistas de caprinos e ovinos; R: Referência Bibliográfica; TL: Técnica Laboratorial

Ano	Região	Espécie	Tamanho da amostra		Tipo de amostra	% Positivo		TL	R
			Animal	Exploração		Animal	Exploração		
2009-13	Centro	BOV	9337	45	BTM	-	ELISA: 37,8 PCR: 20,0	ELISA; PCR	170
		OV		39		-	ELISA: 51,3 PCR: 5,1		
		CAP		13		-	ELISA: 46,2 PCR: 0,0		
		PR		12		-	ELISA: 58,3 PCR: 16,7		
2011	Centro	OV	460	24	Sangue	8,6	37,5	ELISA	171
		CAP		52		10,4	28,8		
		PR		13		-	38,5		
2013	Norte	BOV	9610	90	BTM	-	61,1	ELISA	172
2014	Portugal Continental	OV	1068	20	Sangue	11,4	-	ELISA	176
2014	Norte	BOV	6050	50	BTM	-	62,0	ELISA	177
2015-16	Centro	OV	-	78	BTM	-	2015: 10,2 2016: 25,6	ELISA	173
2015-16	Centro	OV	168	42	Sangue	2015: 7,7 2016: 17,3	-	ELISA	174
2018	Ilha Terceira	BOV	-	132	BTM	-	75,8	ELISA	175
2021	Centro Litoral	BOV	-	84	BTM	-	90,5	ELISA	178
2021	Centro	BOV	5398	30	BTM	-	ELISA: 96,7 PCR: 31,0	ELISA; PCR	179

4 Sinais clínicos da infeção

4.1 Em humanos

Após a exposição de um indivíduo a *Coxiella burnetii*, a infeção que se segue poderá ser de natureza assintomática, em 60% dos casos, ou de carácter sintomático, nos restantes 40%. Dos indivíduos sintomáticos, cerca de 95% desenvolvem sintomas leves, com apenas 5% a necessitarem de hospitalização.^{1,180}

O período de incubação da febre Q varia entre indivíduos, sendo que uma revisão sistemática recente de várias publicações evidenciou que, em 95% dos casos, os primeiros sintomas em humanos parecem ocorrer entre os sete e os 32 dias após a exposição a *C. burnetii*, com um valor mediano de 18 dias.¹⁸¹

A principal característica da forma sintomática da doença, conhecida como febre Q aguda, é o seu pleomorfismo clínico, levando a que o diagnóstico só possa ser atingido por meio de testes sistemáticos.⁴² A expressão da infeção parece estar relacionada com a estirpe de *C. burnetii*, concentração de microrganismos e via de transmissão, assim como diferentes fatores individuais do hospedeiro.^{1,21,42}

Apesar de ser considerada uma doença de carácter autolimitante, 1-5% dos pacientes desenvolvem uma infeção persistente, comumente designada de febre Q crónica, podendo ocorrer meses ou anos após exposição.^{74,182} No entanto, alguns autores consideram esta designação obsoleta, sugerindo que o seu uso em futuras publicações seja evitado, aconselhando então a designação de complicações a longo prazo.^{44,183-186}

Na Figura 9 encontra-se apresentada a progressão natural da infeção por *C. burnetii* em humanos.

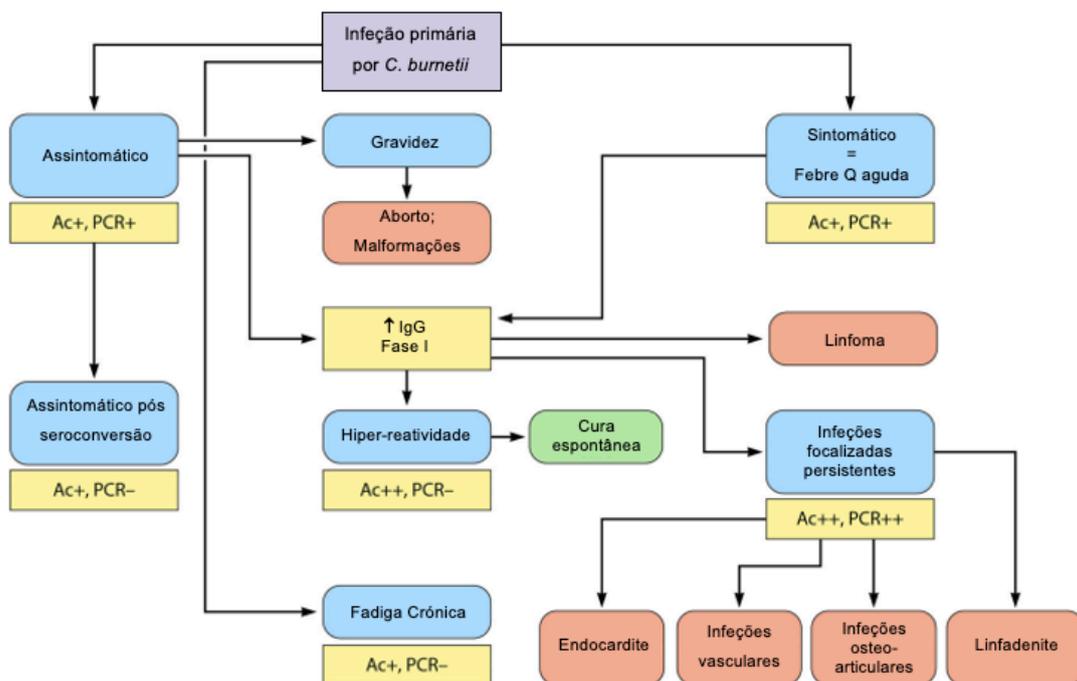


Figura 9 - Progressão natural da infeção por *Coxiella burnetii* em humanos.⁴⁴

4.1.1 Febre Q aguda

No que diz respeito à febre Q aguda, os três principais sinais clínicos incluem febre, pneumonia e hepatite, podendo estes coexistir em determinados casos.^{1,42,182} Num estudo realizado em França, de 323 pacientes hospitalizados por febre Q aguda, 25% apresentaram os três sintomas, 40% manifestaram febre e níveis aumentados de enzimas hepáticas, 17% febre e alterações pulmonares, sendo que apenas 8%, 6% e 4% demonstraram isoladamente febre, alterações pulmonares e aumento das enzimas hepáticas, respetivamente.¹

Adicionalmente, estas manifestações clínicas parecem variar entre diferentes regiões geográficas. Na Suíça e Nova Escócia, por exemplo, é mais comum observar-se casos de pneumonia como principal sinal clínico, enquanto que em França, Ontário e Califórnia, os casos de hepatite se revelam mais frequentes.⁸¹

Ocasionalmente, a febre Q aguda pode ainda levar ao desenvolvimento de sintomatologia cardíaca, dermatológica e neurológica.^{44,182}

4.1.1.1 Febre prolongada

A febre causada por *Coxiella burnetii* é de caráter remitente, geralmente com uma duração de nove a 14 dias.¹⁸² A temperatura pode atingir os 40°C e tende a permanecer elevada durante todo o dia, retornando a valores normais entre o 5º a 14º dia. No entanto, na ausência de tratamento, pode apresentar uma duração de 57 dias em alguns pacientes.⁴² Cerca de 25% dos indivíduos com febre Q aguda experienciam uma febre bifásica, sendo que, após a primeira fase, previamente descrita, inicia-se uma segunda fase, com o reaparecimento da febre, usualmente de natureza intermitente e com temperaturas mais baixas. Adicionalmente, a febre causada por *C. burnetii* está geralmente associada a mialgias, cefaleia severa, dor retro-orbital e situações ocasionais de fotofobia.^{1,21}

4.1.1.2 Pneumonia

Nas situações de febre Q aguda em que se verifica pneumonia, a maior parte dos casos são ligeiros, com tosse não produtiva, febre, e alterações mínimas à auscultação. No entanto, alguns pacientes podem apresentar desconforto respiratório agudo, sendo que a duração dos sintomas pode variar entre 10 a 90 dias, com uma taxa de mortalidade de 0,5% a 1,5%.⁷⁴ A presença de sinais extrapulmonares também é frequente, como mialgias, artralgias, bradicardia, dores de garganta, calafrios, náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia.⁴⁴

Os pacientes com envolvimento pulmonar são geralmente mais velhos e imunocomprometidos, menos frequentemente febris, e apresentam uma menor ocorrência de cefaleias e mialgias, quando comparados com pacientes com envolvimento hepático. Complicações associadas a pneumonias por febre Q aguda são raras mas incluem encefalite, falência renal e respiratória, insuficiência cardíaca congestiva e miocardite.⁸¹

4.1.1.3 Hepatite

Os casos de hepatite podem variar de hepatite assintomática a febres prolongadas, com presença de granulomas no fígado, sendo a apresentação de febre Q mais comum a nível mundial.⁴² Os níveis da fosfatase alcalina (FA), de AST e de ALT encontram-se geralmente duas a três vezes superiores aos valores normais, sendo que os pacientes são usualmente mais jovens e imunocompetentes. Neste caso, é mais frequente observarem-se situações de febre, cefaleias e mialgias.⁸¹

Apesar do aumento do nível das enzimas hepáticas e hepatomegalia serem frequentes, a ocorrência de icterícia é considerada rara.^{187,188} Ainda que não tenha sido demonstrada uma correlação entre hiperbilirrubinemia e a severidade da hepatite em casos de febre Q aguda, níveis mais elevados de bilirrubina em circulação estão geralmente associados a febre mais duradoura, tempo de hospitalização mais longo e atrasos na recuperação.¹⁸⁸

A lesão mais frequentemente encontrada após exame histopatológico é a presença de granulomas, em forma de “donut”, constituídos por um vacúolo lipídico central, um anel de fibrina, macrófagos ativados e linfócitos.^{189,190} Ao contrário do vírus da hepatite, que infeta diretamente os hepatócitos, a *C. burnetii* tem como alvo as células de Kupffer, que, quando infetadas, iniciam um processo de inflamação local e formação dos granulomas. Estes, por sua vez, induzem pequenas alterações no parênquima hepático, com um nível de necrose baixo ou mesmo inexistente, explicando o aumento do nível das aminotransferases.¹⁹¹ Apesar de serem comuns em casos de hepatite por *C. burnetii*, estes granulomas, encontrados no parênquima hepático e medula óssea dos pacientes, não são patognomônicos, uma vez que podem ocorrer em muitas outras doenças, como tuberculose, toxoplasmose, leishmaniose e alguns tipos de hepatite de origem viral.¹⁸⁸

Determinados comportamentos do indivíduo, como a ingestão de bebidas alcoólicas, podem afetar a progressão da doença, estando descritos casos de insuficiência hepática aguda em pacientes com alcoolismo, após infecção por *C. burnetii*.^{187,190}

4.1.1.4 Alterações cardíacas

Em pacientes com febre Q aguda, cerca de 2% apresentam envolvimento cardíaco, com miocardite como a principal causa de morte, sendo esta a forma da doença mais severa e com o pior prognóstico.^{42,192} Representando menos de 1% dos casos de febre Q aguda, a miocardite contrasta com as restantes manifestações clínicas da doença, sendo que, de um modo geral, a febre Q apresenta uma taxa de mortalidade de 1-2%, mas, na presença de miocardite, 25% dos casos termina com a morte do paciente.^{193,194} Apesar de ocorrer em indivíduos de todas as idades, a incidência de miocardite por *C. burnetii* parece ser superior em pacientes mais jovens e sem fatores predisponentes para afeções coronárias.¹⁹⁵

Os casos de pericardite, ainda que raros, também poderão ocorrer em pacientes com febre Q aguda, tal como reportado em vários estudos.^{13,196,197} Uma análise de 15 casos de

pericardite por *C. burnetii* demonstrou que esta não ocorre apenas de forma aguda, podendo surgir como complicação a longo prazo. Adicionalmente, dos 15 pacientes, 12 apresentavam febre (>38°C), 11 queixavam-se de dores no peito e três apresentavam tamponamentos cardíacos severos.¹⁹⁷ Apesar das doenças pericárdicas serem frequentemente classificadas como idiopáticas, tem sido sugerido que a *Coxiella burnetii* possa ser o agente responsável por 4,2% da totalidade de efusões pericárdicas diagnosticadas em pacientes hospitalizados.¹⁹⁸

4.1.1.5 Alterações dermatológicas

Ainda que não seja comum associar sinais clínicos dermatológicos com febre Q, tem sido demonstrado que estes estão presentes em até 20% dos pacientes, sendo as erupções maculopapulares do tronco a apresentação mais observada.¹⁹⁹ Adicionalmente, outras lesões cutâneas como eritema nodoso, eritema anular centrífugo e paniculite associada a vasculite também se encontram descritas, não só no tronco, como também nos membros e face de alguns pacientes diagnosticados com febre Q aguda.^{200–203}

4.1.1.6 Alterações neurológicas

Diversos estudos sugerem que a cefaleia é a manifestação neurológica mais comum em casos de febre Q aguda, considerando as meningoencefalites uma apresentação mais rara da doença.^{1,21,204} Em contexto hospitalar, são reportadas cefaleias severas em até 40% dos casos, sendo que meningites e encefalites parecem ocorrer em 2-4% dos pacientes. Para além das meningoencefalites, encontram-se descritos casos de lesões focais do nervo ótico, cerebelo, e lobos cerebrais, assim como neuropatias periféricas.²⁰⁵

Em casos de febre Q aguda, o tipo de exposição ocupacional de cada indivíduo poderá influenciar o risco de desenvolver sintomatologia neurológica, sendo que pacientes com envolvimento do sistema nervoso central parecem reportar mais frequentemente contacto prévio com caprinos, quando comparados com pacientes que manifestam outras formas da doença.²⁰⁶

De uma forma geral, o prognóstico da febre Q aguda é bom na maioria das formas da doença. No entanto, tal como em situações de miocardite, o prognóstico em casos de meningoencefalite é usualmente mais severo, apresentando uma taxa de mortalidade mais elevada.^{196,207}

4.1.2 Febre Q crónica vs Complicações a longo prazo

Relativamente à nomenclatura da febre Q “crónica”, existe alguma discórdia entre vários autores.^{21,183,184} Em 2012, foram publicados novos critérios para classificá-la como i) possível, por meio de critérios serológicos, ii) provável, pela associação de critérios serológicos e sintomatologia clínica variável, e iii) comprovada, definida por testes de PCR positivos em sangue e amostras de tecido ou por critérios serológicos associados a endocardite e/ou infeções

vasculares.²¹ No entanto, a presença de títulos elevados de anticorpos anti-*C. burnetii* nem sempre está relacionada com a existência de infecções focais persistentes, tal como demonstrado num surto na Guiana Francesa, onde se observaram títulos muito elevados mas raramente foram diagnosticadas estas complicações.⁴⁴ Uma identificação mais precisa destes focos de infecção permite prevenir complicações em órgãos-alvo, possivelmente fatais a longo prazo, assim como evitar efeitos secundários de administrações medicamentosas em pacientes que apenas demonstrem isoladamente testes serológicos elevados.¹⁸³

Além das infecções focais persistentes, alguns pacientes podem desenvolver um estado de cansaço prolongado.^{184,186,208} A síndrome de fadiga pós-febre Q (QFS) pode manifestar-se vários anos após infecção primária por *Coxiella burnetii*, sem qualquer evidência de infecção persistente, representando mais uma das possíveis complicações a longo prazo da doença.⁴⁴

4.1.2.1 Infecções focais persistentes

Na febre Q, os órgãos mais afetados no decorrer de infecções focais persistentes incluem o coração, artérias, ossos e fígado, podendo, tal como referido, desenvolver-se complicações meses ou mesmo anos após a fase aguda da doença.⁷⁴ Pacientes com afeções valvulares, arterite infecciosa, implantes vasculares ou imunocomprometidos estão mais predispostos a estas complicações, sendo a endocardite a manifestação da doença mais frequentemente observada.¹⁸²

4.1.2.1.1 Endocardite e infecções vasculares

A endocardite crónica é a manifestação mais comum e severa das complicações a longo prazo observadas após infecção por *C. burnetii*, podendo ser fatal em 5-60% dos casos.^{13,209} Geralmente, as manifestações clínicas são inespecíficas, como febre, calafrios, perda de peso e hepatoesplenomegalia.²⁰ A sua incidência é maior em indivíduos do sexo masculino com mais de 40 anos de idade, ocorrendo em praticamente todos os pacientes com valvulopatias concomitantes, nomeadamente quando há envolvimento das válvulas mitral e aórtica.⁴² Como tal, justifica-se a realização de ecocardiografias sistemáticas em pacientes previamente diagnosticados com febre Q aguda, de forma a detetar estas lesões predisponentes e iniciar um possível tratamento profilático.²¹⁰ No entanto, alguns pacientes podem demonstrar uma infecção latente, permanecendo assintomáticos durante anos, sem lesões vegetativas detetáveis à ecocardiografia, enquanto a bactéria destrói gradualmente as válvulas cardíacas.¹⁸⁵

As infecções vasculares representam a segunda forma mais comum de complicações a longo prazo da febre Q, ocorrendo principalmente em pacientes com lesões preexistentes, como aneurismas e enxertos vasculares.^{185,211} Os sintomas mais comuns incluem febre, perda de peso, fadiga e dor abdominal, sendo que a porção infrarrenal da aorta parece ser o segmento mais afetado.²¹¹ Algumas complicações incluem fistulas aortoduodenais, levando a hemorragias

severas, espondilodiscite, rotura de aneurismas e embolias.^{212,213} O prognóstico geral das infeções vasculares por *C. burnetii* é mau, com uma taxa de mortalidade de 18-26%.⁴⁴

4.1.2.1.2 Infeções osteoarticulares

Inicialmente consideradas acontecimentos raros, as infeções osteoarticulares por *C. burnetii* têm vindo a ser cada vez mais reportadas, principalmente em crianças, nas quais a osteomielite parece ser a forma mais comum de complicações a longo prazo da febre Q.^{196,214} Esta ocorre geralmente nos membros inferiores, particularmente nas epífises de ossos longos e nos ossos do pé, e na parede torácica, podendo apresentar uma natureza isolada ou multifocal.^{44,214}

4.1.2.1.3 Outras complicações

Outras complicações a longo prazo da infeção por *Coxiella burnetii* incluem hepatite crónica com possível evolução para cirrose, principalmente em pacientes com hábitos de alcoolismo, fibrose pulmonar, pseudotumores do baço e pulmão, tiroidite, nefrite e anemia hemolítica.^{182,211,215-217} Casos de linfadenite persistente também se encontram descritos, constituindo, por sua vez, um fator de risco para o desenvolvimento de linfomas.²¹⁸

4.1.2.2 Síndrome de fadiga pós-febre Q

Excluindo as afeções cardiovasculares, a QFS é considerada a complicação a longo prazo mais importante da infeção por *Coxiella burnetii*, descrita em 20-30% dos pacientes em vários estudos a nível global, tendo efeitos emocionais e socioeconómicos consideráveis.^{208,219} Caracterizada como um estado de fadiga prolongada, estabelecido no seguimento de febre Q aguda, a QFS pode ter uma duração de seis meses a mais de dez anos, estando geralmente associada a afeções musculoesqueléticas e pulmonares, problemas neurocognitivos, cefaleias, distúrbios de sono e transtornos do humor.²²⁰

Apesar de não existir um consenso no que diz respeito à sua etiologia, tratamento e prognóstico, uma das possíveis causas da QFS parece ser a desregulação da produção de citocinas, induzida por antigénios como o LPS e proteínas residuais da bactéria, e não pela persistência de *Coxiella burnetii* latente.^{208,221} Relativamente ao tratamento, a terapia cognitivo-comportamental aparenta ser uma melhor opção quando comparada com administração de antibacterianos.¹⁸⁶

4.1.3 Febre Q em mulheres grávidas

Relativamente às mulheres grávidas, foi demonstrado que as infeções por *Coxiella burnetii* são menos sintomáticas que o observado noutras mulheres e nos homens,

permanecendo assintomáticas em mais de 90% dos casos.^{222,223} Como tal, é comum que sejam muitas vezes subdiagnosticadas, colocando-as em maior risco de desenvolver infeções persistentes. A ausência de tratamento em situações de febre Q, nomeadamente no primeiro trimestre de gestação, está associada a abortos espontâneos, possivelmente recorrentes, nados-mortos, restrição do crescimento intrauterino, nascimentos prematuros e morte fetal.^{224–226}

O momento da gestação no qual se dá a infeção também parece estar relacionado com a probabilidade de desenvolver problemas a longo prazo. Um estudo demonstrou que 80% das pacientes grávidas, cuja infeção ocorreu no primeiro trimestre, desenvolveu este tipo de complicações, demonstrando quase o dobro da incidência observada em pacientes infetadas no segundo e terceiro trimestre.⁸¹ As explicações para as complicações verificadas durante a gravidez incluem danos diretos à placenta, por ação da bactéria, danos indiretos por insuficiência placentária, causada pela modulação da resposta inflamatória, e ainda infeções do próprio feto, uma vez que *C. burnetii* já foi isolada tanto de placentas como de tecido fetal.¹¹⁴

De um modo geral, a testagem sistemática durante a gravidez é recomendada após situações febris ou de partos problemáticos. Em casos associados a surtos de febre Q, ou nas situações em que o contacto com animais se revela frequente, aconselha-se a testagem sistemática a todas as mulheres grávidas, procedendo ao tratamento e monitorização em casos positivos, e à testagem mensal nos casos negativos.²²³

4.2 Sinais clínicos nos ruminantes domésticos

Comparativamente à febre Q aguda nos humanos, a infeção por *Coxiella burnetii* nos animais é mais frequentemente afebril e subclínica. Como tal, a denominação de febre Q animal não é a mais correta, devendo utilizar-se o termo coxielose.²²⁷ Apesar de se verificar uma ocorrência mundial de infeções por *Coxiella burnetii* nos ruminantes domésticos, comprovada pela presença de animais seropositivos em várias regiões do globo, o conhecimento da fase aguda da doença é bastante reduzido.²²⁸

Em infeções crónicas, os locais mais afetados incluem o útero e a glândula mamária, sendo que a coxielose se manifesta maioritariamente a nível reprodutivo, sendo responsável por abortos, nados-mortos e nascimento de vitelos fracos e inviáveis.^{1,88} De um modo geral, estes distúrbios apresentam uma maior expressão nos ovinos e caprinos, sendo que nos bovinos é mais comum observarem-se casos de infertilidade, metrites e mastites.¹⁴

Situações de pneumonia, retenção de membranas fetais e placentite também se encontram descritos nos ruminantes domésticos, sendo, portanto, importante compreender como é que a infeção se desenvolve na placenta e conseqüentemente no feto, quando se interpretam os dados laboratoriais de descendência afetada.^{22,229} Deve ter-se em consideração que, a existência de problemas como a ocorrência de nados-mortos ou nascimento de vitelos fracos não devem ser tratados como acontecimentos isolados, mas sim como possíveis desfechos das infeções intrauterinas por *Coxiella burnetii*, representados na Figura 10. O desfecho, por sua vez, depende de fatores como a virulência da estirpe de *C. burnetii*, a resposta imunitária materna e

fetal, a severidade da lesão placentária, a possível transmissão ao feto e o grau de disseminação da bactéria no mesmo, idade da gestação e número de fetos infetados.²²⁸

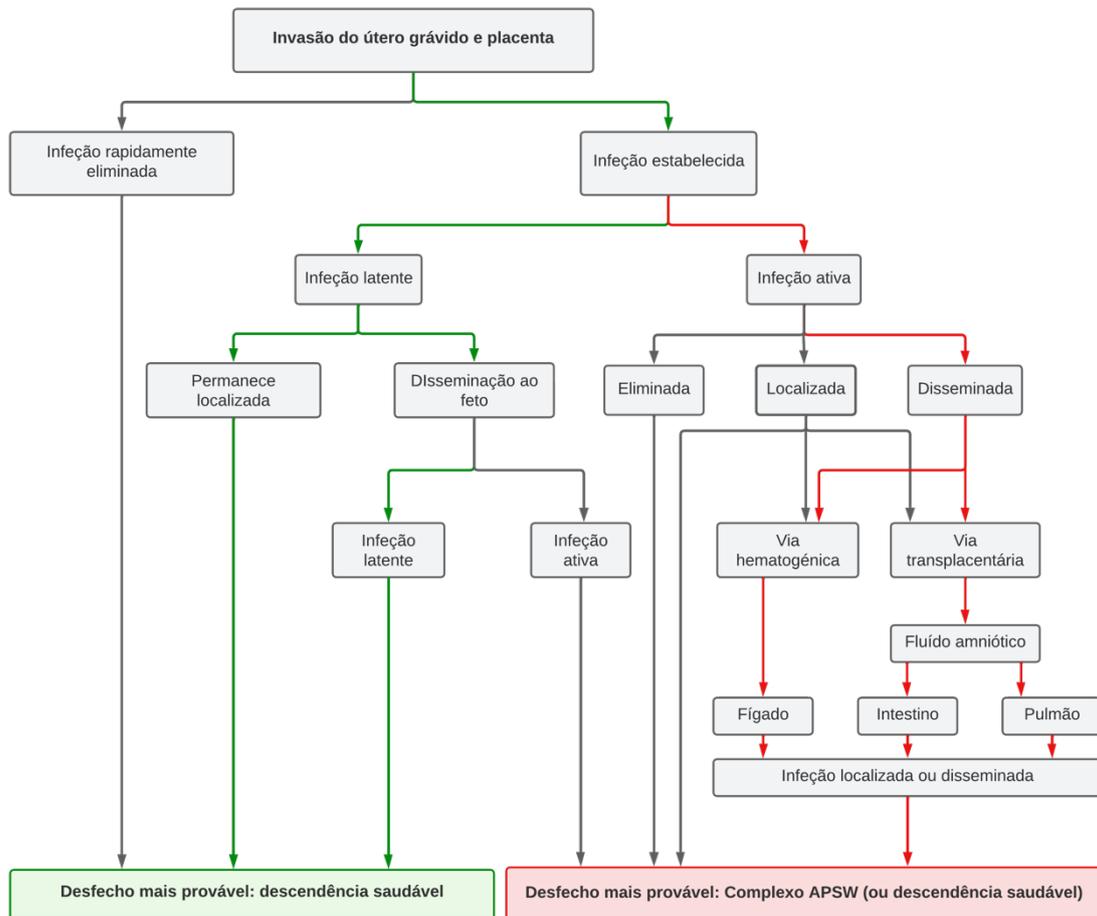


Figura 10 - Possíveis desfechos de uma infeção intrauterina por *Coxiella burnetii* em animais gestantes. O conhecimento da disseminação intrauterina de *C. burnetii* é limitado, pelo que os dados mais recentes indicam que a infeção pode seguir um de dois trajetos mais prováveis: uma infeção latente (setas verdes) que permanece localizada na placenta ou se dissemina ao feto, mantendo-se latente, correspondendo ao desfecho mais comum nos bovinos; uma infeção ativa (setas vermelhas) que pode permanecer limitada à placenta ou disseminar-se ao feto, por via hematogénica ou transplacentária, podendo resultar em abortos, partos prematuros, nados-mortos e fetos inviáveis, que juntos constituem o Complexo APSW. (Adaptado de ²²⁸)

4.2.1 Sinais clínicos de coxielose em bovinos

Tal como referido, na sua forma aguda, a coxielose raramente apresenta manifestações clínicas nos bovinos, sendo a forma crónica responsável por alguns distúrbios reprodutivos.¹⁸²

Em estudos experimentais precoces, antes da implementação de medidas de biossegurança mais restritas, as vacas seronegativas desenvolveram febre de carácter autolimitante, dois a três dias após inoculação subcutânea da estirpe Nine Mile de *C. burnetii*. Em novilhas inoculadas por via intradérmica com a estirpe C9, também se verificaram respostas febris associadas a pneumonia, atingindo temperaturas corporais de 41°C, 24 a 36 horas após inoculação.²²⁸ No entanto, ao contrário do que se verifica em humanos e vacas

experimentalmente infetadas, os ruminantes raramente apresentam manifestações respiratórias ou cardíacas após infecção por *Coxiella burnetii*.¹⁴

Em bovinos, o aborto associado a coxielose é um acontecimento raro.^{230,231} Este é definido como a expulsão prematura do feto entre o 50º e 270º dia de gestação, sendo que uma taxa anual de até 5% poderá ser considerada normal numa exploração.²³² Em casos de coxielose, os abortos são atribuídos à placentite resultante da infecção dos trofoblastos por *Coxiella burnetii*, sendo frequentemente diagnosticados numa fase mais tardia da gestação.^{228,233} Adicionalmente, a seroprevalência de anticorpos anti-*C. burnetii* parece superior em vacas abortadas no último trimestre. No entanto, é importante ter em consideração que isto poderá dever-se ao facto de serem enviados para análise laboratorial um número superior de fetos mais desenvolvidos, comparativamente a fetos mais precoces.²²⁸ Ainda que os abortos nos bovinos sejam menos comuns que nos pequenos ruminantes, a coxielose continua a representar um risco zoonótico, dada a excreção prolongada da bactéria através do leite.²³⁴ Tendo em conta a duração da excreção e o elevado tropismo que a *C. burnetii* apresenta para a placenta e glândula mamária, estão descritas situações de mastite clínica e subclínica em vacas leiteiras.^{182,235,236} De forma a explorar a relação entre a excreção de *C. burnetii* no leite e situações de mastites, um estudo nos EUA demonstrou que a presença da bactéria em cada quarto mamário está fortemente associada a mastites crónicas subclínicas, uma vez que a contagem de células somáticas (CCS) se revelou mais elevada em situações positivas ao teste de PCR.²³⁵

A placentite é uma das principais lesões observadas após infecção por *C. burnetii*, havendo uma forte relação entre a presença da bactéria e a sua ocorrência. Esta pode ser acompanhada por situações de necrose placentária e broncopneumonia fetal, estando as lesões no feto geralmente restringidas aos pulmões.^{233,237} No entanto, a ocorrência de lesões fetais não é muito comum, pelo que, para obtenção de um diagnóstico de coxielose mais correto, a submissão dos fetos para análise laboratorial deve incluir a placenta das vacas abortadas.²³⁷

Apesar de alguns estudos associarem a presença de *C. burnetii* a situações de retenção das membranas feitas, infertilidade, esterilidade e metrite/endometrite, não existem evidências sólidas que comprovem essa relação de forma consistente.^{182,228,238}

4.2.2 Sinais clínicos em pequenos ruminantes

Relativamente aos pequenos ruminantes, já foram conduzidos alguns estudos da fase aguda da infecção por *Coxiella burnetii* em fêmeas gestantes experimentalmente infetadas.^{239–243} Em ovelhas, foram observados casos de febre, atingindo temperaturas até 40,9°C, com dois a três dias de duração, cinco a sete dias após a inoculação endovenosa e intraperitoneal da estirpe *Tchilnov*. A febre, por sua vez, foi acompanhada de depressão, hipersialia, rinite, conjuntivite e taquipneia resultante de pneumonia intersticial. Alguns dias antes do parto, a condição geral das fêmeas foi deteriorando-se, resultando em nados-mortos ou fetos inviáveis e placentas necróticas e/ou inflamadas. Em cabras, após inoculação da estirpe CbC1 de *C. burnetii*, foi observado um aumento de temperatura dose-dependente, verificando-se temperaturas de até

40,5°C. A febre desenvolveu-se três dias após a inoculação, tendo uma duração de três a cinco dias. As inoculações foram realizadas ao 84º ou 90º dia de gestação, sendo que, a partir dos 25 dias pós-inoculação, foram observados abortos dose-independentes ao longo do restante período gestacional.²²⁸

Os casos de aborto são mais frequentes nos pequenos ruminantes, sendo que as taxas podem variar entre 3% e 80%. No entanto, taxas de aborto elevadas raramente se observam, exceto em alguns rebanhos de caprinos, uma vez que estes parecem ser a espécie mais suscetível.^{22,234} Apesar dos fetos abortados aparentarem ser normais, as placentas infetadas apresentam fibrose intercotiledonar e exsudados descolorados não específicos. Adicionalmente, a *C. burnetii* parece induzir respostas inflamatórias severas no miométrio em caprinos.²⁴⁴

Em explorações onde tenham ocorrido surtos de aborto, é comum que se verifiquem problemas reprodutivos na época de partos seguinte, uma vez que se pode estabelecer uma infecção latente, com posterior reativação da multiplicação de *C. burnetii* durante a nova gestação. Geralmente, até 90% das fêmeas reprodutoras podem estar infetadas num rebanho, sendo que, quando se verificam abortos, nomeadamente na fase final da gestação, assim como nados-mortos e fetos inviáveis, a coxielose deverá ser incluída na lista de diagnósticos diferenciais.²⁴⁵

Ainda que exista uma associação entre a coxielose e a ocorrência de mastites em bovinos leiteiros, o mesmo carece de estudos no que diz respeito aos pequenos ruminantes.²²⁸

5 Diagnósticos diferenciais

Nos ruminantes domésticos, várias doenças podem apresentar manifestações clínicas semelhantes ao que se observa na coxielose, pelo que possíveis diagnósticos diferenciais incluem outras causas de distúrbios reprodutivos, nomeadamente aborto e infertilidade, como leptospirose, brucelose, listeriose e salmonelose (Tabela 8).^{246,247} Apesar de poder ter origem em fatores não infecciosos, como anormalidades genéticas, stress térmico, traumas, deficiências nutricionais e agentes tóxicos, o aborto nos ruminantes está mais frequentemente associado a agentes infecciosos, seja de etiologia bacteriana, viral, fúngica ou protozoária.²⁴⁸

Em humanos, dada a amplitude do espectro de apresentações clínicas da febre Q, múltiplas etiologias devem ser consideradas no momento do diagnóstico. Possíveis diagnósticos diferenciais incluem hepatites virais, pneumonia por *Pneumococcus* e outros microrganismos atípicos, meningite meningocócica, doença de Lyme, brucelose, leptospirose e algumas riquetsioses.²⁴⁹

Tabela 8 - Possíveis diagnósticos diferenciais de coxielose nos ruminantes domésticos. BVDV: Vírus da diarréia viral bovina; BHV-1: Herpesvírus bovino tipo 1; R: Referência bibliográfica

Causas	Manifestações reprodutivas	R
Bacterianas		
<i>Brucella</i> spp.	Abortos tardios; nados-mortos; fetos inviáveis, retenção da placenta; metrite; edema da placenta e necrose dos cotilédones; infertilidade; possível pneumonia fetal	248,250
<i>Campylobacter</i> spp.	Abortos esporádicos em fases avançadas da gestação; placentite; broncopneumonia fetal	248,250
<i>Chlamydophila</i> spp.	Abortos tardios; nados-mortos; fetos inviáveis; infertilidade; endometrite	250,251
<i>Leptospira</i> spp.	Abortos na fase final da gestação; placenta avascular; frequente morte fetal	248,250
<i>Listeria monocytogenes</i>	Abortos esporádicos na fase final da gestação; placentite; necrose multifocal dos cotilédones; possível necrose hepática multifocal no feto	248,250
<i>Salmonella</i> spp.	Abortos esporádicos na fase final da gestação, frequentemente sem outros sinais clínicos associados	248,250
Virais		
BVDV	Abortos em qualquer fase da gestação; infertilidade; anomalias congénitas	250,252
BHV-1	Abortos esporádicos; possíveis focos necróticos no fígado dos fetos; geralmente associada a doença respiratória prévia ou concomitante	248,250
Fúngicas		
<i>Aspergillus</i> spp.	Abortos esporádicos; lesões difusas ou multifocais nos cotilédones; lesões cutâneas no feto	248,250
Protozoárias		
<i>Neospora caninum</i>	Abortos esporádicos; nados-mortos; infertilidade; encefalite e miocardite fetal	248,250
<i>Toxoplasma gondii</i>	Abortos na fase final de gestação; anomalias congénitas; morte fetal	250,253

6 Métodos de diagnóstico de febre Q

Uma deteção eficiente de *Coxiella burnetii*, nomeadamente nos ruminantes domésticos, representa um ponto crítico no controlo da disseminação da febre Q entre animais e dos animais para os humanos.^{146,254} Nestas espécies, tal como referido, as infeções são maioritariamente assintomáticas, constituindo um desafio no momento do diagnóstico, seja na investigação de surtos abortivos, na avaliação de riscos zoonóticos, ou na determinação de animais isolados e/ou grupos de animais como livres de infeção.²⁵⁵

Nos animais, a coxielose pode ser diagnosticada por meio de métodos diretos, como imunohistoquímica (IHC) e PCR, assim como métodos indiretos, nomeadamente CFT, ELISA e

IFA. De forma a atingir-se um diagnóstico mais conclusivo do estado de uma infeção a nível de exploração, os protocolos mais recentes recomendam uma associação de métodos diretos e indiretos.^{170,256} Na caso da UE, a EFSA sugere uma abordagem diagnóstica padronizada, por meio de PCR e ELISA.²⁵⁷

Para se determinar a presença ou ausência de infeção por *C. burnetii* em explorações de ruminantes, deve ter-se em consideração as vantagens e limitações de cada teste de diagnóstico em vários cenários clínicos. Os métodos diretos de diagnóstico, que pesquisam a presença da bactéria, assim como os métodos indiretos, que pesquisam evidências de exposição prévia à bactéria, encontram-se descritos na Tabela 9 e 10, respetivamente.²⁵⁵

6.1 Métodos diretos de diagnóstico de febre Q

Tal como referido, os métodos de diagnóstico diretos detetam a presença de *Coxiella burnetii* ou de um dos seus componentes na amostra, destacando-se os métodos de PCR, IHC e cultura bacteriana.¹⁴

O PCR oferece benefícios substanciais na identificação de *Coxiella burnetii* comparativamente a outros meios de diagnóstico, especialmente nas fases iniciais da doença onde não se verifica a presença de anticorpos, apresentando elevados valores de sensibilidade e especificidade.^{258,259} Face às limitações do PCR convencional, incapaz de quantificar a bactéria presente, o desenvolvimento do qPCR em tempo real (RT-qPCR) permitiu obter uma ferramenta de diagnóstico rápido, capaz de oferecer informação quantificável.¹⁴ Este pode ser útil para determinar se *C. burnetii* é de facto o agente causal em situações de aborto em ruminantes, ou se é apenas excretada simultaneamente, uma vez que fêmeas abortadas apresentam valores de *cycle threshold* (Ct) correspondentes a um número de microrganismos muito superior ao verificado em fêmeas assintomáticas com excreção persistente.²⁵⁵ Existem vários *kits* de PCR disponíveis para deteção de DNA de *Coxiella burnetii*, sendo o gene alvo *IS1111*, presente em múltiplas cópias no genoma da bactéria, comumente utilizado.^{44,255}

Ainda que os testes moleculares sejam adequados para uma rápida identificação de *C. burnetii* nos tecidos e fluídos corporais, a deteção isolada da bactéria pode não representar significado diagnóstico, uma vez que esta pode ser transportada e excretada por animais saudáveis.²³⁷ Adicionalmente, outra limitação do PCR assenta na sua incapacidade de distinguir bactérias viáveis de inviáveis, sendo que a deteção isolada de DNA da bactéria não é sinónimo da sua viabilidade, nomeadamente nas situações em que os valores de Ct são elevados. No entanto, deteções repetidas, acompanhadas por uma diminuição dos valores de Ct, são indicativas de um aumento das cópias do genoma de *C. burnetii* e, conseqüentemente, de crescimento bacteriano.²⁶⁰

A reação imune provocada em vários órgãos por ação de *Coxiella burnetii* pode ser desvendada através da análise histopatológica.⁴⁴ O método de IHC permite detetar *C. burnetii* em tecidos fixados com parafina ou acetona, tendo vindo a ser utilizado no diagnóstico de complicações a longo prazo da febre Q.²⁶¹ Um método desenvolvido com base no complexo

avidina-biotina-peroxidase para diagnóstico de rotina em pequenos ruminantes demonstrou ser uma ferramenta de diagnóstico rápido, não necessitando de bactérias viáveis ou tecido fresco. Como tal, esta técnica poderá permitir a realização de estudos retrospectivos a partir de amostras previamente armazenadas. No entanto, o uso da IHC não se revela útil em estudos epidemiológicos de grande escala.¹⁴

Apesar de ser pouco praticada, a cultura de *C. burnetii* continua a ser um método de diagnóstico útil nos casos em que é necessário isolar a bactéria de tecidos contaminados com múltiplas bactérias. Contudo, devido à sua elevada capacidade infecciosa, o isolamento de *Coxiella burnetii* só pode ser efetuado em laboratórios de biossegurança nível 3.²⁶² Adicionalmente, de um ponto de vista técnico, a cultura da bactéria é um processo difícil de realizar e apresenta uma sensibilidade baixa. Recentemente, foi desenvolvido um meio axénico estritamente relacionado com as necessidades metabólicas de *C. burnetii* no fagolisossoma, permitindo que esta possa desenvolver-se fora duma célula hospedeira. Esta descoberta revolucionária tornou então possível a realização de novos estudos relacionados com o agente causal da febre Q.¹⁴

Tabela 9 - Métodos de diagnóstico diretos e tipos de amostra mais utilizados na deteção de evidências de infeção por *Coxiella burnetii*²⁵⁵

Teste laboratorial	Tipo de amostra	Considerações
Observação direta da bactéria	<ul style="list-style-type: none"> • Placenta com pelo menos um a dois cotilédones • Tecido fetal • Muco vaginal 	<ul style="list-style-type: none"> • Cocobacilos rosa/ avermelhados, usualmente com corantes de Ziehl-Neelsen, Gimenez e Giemsa • Confirmado por IHC
PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Materiais de aborto • Amostras de leite individuais • BTM • Produtos derivados do leite • Fezes • Muco vaginal • Amostras ambientais 	<ul style="list-style-type: none"> • Indica a presença de DNA da bactéria, resultante de infeção ou contaminação • PCR quantitativo (qPCR) permite uma melhor interpretação dos resultados: <1000 cópias do gene IS1111/μL geralmente não é considerado um resultado significativo • A sensibilidade e especificidade do teste depende do gene alvo do ensaio • PCR no sangue pode complementar, mas não deverá substituir outros métodos de diagnóstico, uma vez que a sua sensibilidade para este tipo de amostra não se encontra bem definida
Cultura bacteriana	<ul style="list-style-type: none"> • Materiais de aborto • Amostras de leite individuais • BTM • Produtos derivados do leite 	<ul style="list-style-type: none"> • Raramente realizadas devido ao risco humano e necessidades fastidiosas para o crescimento da bactéria

	<ul style="list-style-type: none"> • Fezes • Muco vaginal • Amostras ambientais 	<ul style="list-style-type: none"> • Tem de ser realizado em laboratórios de biossegurança nível 3 • Necessita de níveis altos de excreção para ser realizada de forma fidedigna
--	--	--

6.2 Métodos indiretos de diagnóstico de febre Q

Os métodos de diagnóstico indiretos identificam respostas imunitárias humorais ou celulares específicas face a uma exposição prévia a *Coxiella burnetii*.¹⁴ Os testes serológicos avaliam a presença de anticorpos específicos para as formas antigénicas de fase I e fase II de *Coxiella burnetii*, pelo que, na maioria dos testes comerciais disponíveis para ruminantes, o resultado obtido corresponde ao somatório dos títulos de Ac específicos para cada uma das fases.^{44,255}

Os testes de ELISA podem ser realizados no soro, plasma e leite de ruminantes, sendo facilmente aplicados em estudos a larga escala. Ainda que sejam adequados para testar um grande número de animais e explorações, os métodos de ELISA não permitem identificar animais excretores, uma vez que não existe uma relação consistente entre seropositividade e grau de excreção de *C. burnetii*.^{14,22} De forma a melhor entender esta relação, um estudo com bovinos leiteiros demonstrou que cerca de 50% das vacas com níveis persistentemente elevados de seropositividade apresentavam, por sua vez, um tipo de excreção persistente, com as restantes a demonstrarem uma excreção esporádica ou mesmo inexistente.²⁶³ No entanto, deve ter-se em consideração que animais seronegativos podem continuar a excretar a bactéria, independentemente do teste laboratorial utilizado.²⁵⁵

Em medicina humana, os testes indiretos de imunofluorescência indireta (IFA) representam o método de diagnóstico de referência, dada a sua elevada sensibilidade e especificidade, sendo o mais utilizado a nível global.¹⁴ Um estudo com caprinos demonstrou uma boa concordância entre os valores obtidos nos testes de IFA e ELISA, com o último a mostrar-se ligeiramente mais sensível. Adicionalmente, verificou-se uma associação entre valores elevados de seropositividade e a ocorrência de abortos.²⁶⁴

Os testes de ELISA e IFA apresentam maior sensibilidade que o CFT na deteção de Ac anti-*C. burnetii* na fase aguda da doença, tanto em humanos como nos animais. O CFT dificilmente permite diagnosticar infeções recentes, uma vez que os Ac detetados por este método podem persistir após a doença aguda.²² Para além de apresentar menor sensibilidade que os métodos de ELISA e IFA, o CFT é também menos específico e mais trabalhoso. Este é incapaz de detetar todas as subclasses de IgG, sendo que nos ruminantes só a IgG1 é que se fixa ao complemento. Adicionalmente, IgG2, IgM e substâncias anti-complemento potencialmente presentes no soro, podem interferir com a fixação de IgG1 ao complemento, diminuindo, portanto, o valor do título de IgG1 detetado pelo CTF.¹⁴

Tabela 10 - Métodos de diagnóstico indiretos e tipos de amostra mais utilizados na deteção de evidências de exposição prévia a *Coxiella burnetii*²⁵⁵

Teste laboratorial	Tipo de amostra	Considerações
ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Soro sanguíneo • Amostras de leite individuais • BTM 	<ul style="list-style-type: none"> • Método mais utilizado para testagem em grande escala • Boa concordância com os resultados dos testes de IFA
IFA	<ul style="list-style-type: none"> • Soro sanguíneo • Amostras de leite individuais • BTM 	<ul style="list-style-type: none"> • Teste serológico definitivo em medicina humana • Menos utilizado em veterinária devido aos requerimentos técnicos exigidos • Muito boa concordância com resultados obtidos nos testes de ELISA
CFT	<ul style="list-style-type: none"> • Soro sanguíneo • Amostras de leite individuais • BTM 	<ul style="list-style-type: none"> • Método menos sensível que a maioria dos testes de ELISA • Boa especificidade • Amostras ELISA negativas podem demonstrar títulos baixos no teste de CFT, possivelmente detetando IgM • Uso limitado em espécies pecuárias

7 Controlo e prevenção

Dado que a transmissão entre humanos é extremamente rara e a febre Q é principalmente transmitida por aerossóis, boas medidas de biossegurança devem ser implementadas de forma a minimizar ou prevenir a exposição dos humanos a animais infetados e ambientes contaminados.²² Tal como se verifica em todas as outras zoonoses, o controlo da coxielose nos animais irá influenciar a expressão da doença nos humanos.²³⁴

Devem ser tomados cuidados acrescidos quando se introduz um novo animal numa exploração livre de coxielose. Idealmente, é aconselhada a realização de uma investigação serológica prévia na exploração de origem e, em casos de seropositividade para *C. burnetii*, apenas introduzir esses animais em explorações seropositivas ou vacinadas.^{22,88} Por sua vez, a quarentena de novos animais também deve ser uma prática a considerar, principalmente em explorações sem evidências prévias de infeção.¹⁶⁴

Os animais no periparto devem ser mantidos isolados de outros animais, nomeadamente jovens e gestantes, em locais fechados, com fluxo de ar controlado. Isto permite reduzir o risco de transmissão aerógena aos restantes animais da exploração que se encontrem localizados a favor do vento.²⁵⁵ Adicionalmente, este local deve permitir uma fácil desinfeção, devendo proceder-se também à desinfeção de todos os equipamentos utilizados no momento do parto. Os produtos de alto risco resultantes de partos/abortos devem ser posteriormente incinerados ou enterrados com aplicação de cal, para que não sejam ingeridos por carnívoros domésticos ou

selvagens.^{14,22} Dada a elevada capacidade de *Coxiella burnetii* se agregar a partículas de pó, os locais secos, particularmente próximos a áreas de circulação animal, devem ser mantidos ligeiramente humedecidos, para que não induzam facilmente a formação de poeiras contaminadas.²⁵⁵

Nas explorações que apliquem estrume/chorume nos campos, este deve ser previamente tratado com cal viva ou cianamida cálcica a 0,6%, sendo desaconselhado o seu transporte e aplicação em dias mais ventosos.^{88,255} Alguns países apresentam legislação relativa a este fator de risco, sendo que, nos Países Baixos, a aplicação de estrume de explorações infetadas é proibida por um período mínimo de 90 dias após suspeita de infeção.¹⁴

As populações humanas devem evitar situações que levem à exposição a *C. burnetii*, adotando boas práticas de higiene, nomeadamente a lavagem frequente das mãos, e utilizando material de proteção individual descartável. Este deverá incluir bata, luvas e máscara, sendo o seu uso particularmente importante no momento do parto. Uma desinfeção frequente das instalações está também associada a um menor risco de seroconversão em produtores agrícolas, com desinfetantes como hipoclorito a 1%, *Virkon® S*, e etanol a 70%, a demonstrarem algum nível de eficácia na desativação de *C. burnetii*.²⁵⁵ Para além de boas práticas de higiene e desinfeção, a implementação de estratégias de controlo de vetores, nomeadamente carraças, poderá contribuir para a diminuição da carga bacteriana ambiental.^{42,265}

Dado que a febre Q é uma doença muito subdiagnosticada, os grupos com maior risco ocupacional devem ser mantidos bem informados relativamente às possíveis manifestações clínicas da mesma, tanto nos humanos como nos animais.²²

7.1 Terapêutica

De um modo geral, a eficácia do uso de antimicrobianos no combate ao aborto e excreção causados por *Coxiella burnetii* ainda não se encontra totalmente comprovada.²⁵⁵

Nos ruminantes, a terapêutica consiste geralmente em duas administrações injetáveis de oxitetraciclina, numa dose de 20 mg/kg de peso vivo, durante o último mês de gestação, ainda que este tratamento não previna totalmente a ocorrência de abortos e a excreção de *C. burnetii*.^{22,42}

Um estudo recente em bovinos leiteiros procurou relacionar diferentes regimes de vacinação e administração de oxitetraciclina injetável com a excreção de *Coxiella burnetii*, com base em amostras de BTM. Os resultados obtidos demonstraram que nenhum dos regimes de antibioterapia se associou a um padrão de excreção favorável, pelo que o uso de antibióticos deverá estar limitado a situações particulares, e não tido como um procedimento sistemático. Adicionalmente, não foi realizado o isolamento de *Coxiella burnetii* a partir de amostras positivas, pelo que uma possível resistência às tetraciclinas, não investigada neste estudo, não pode ser excluída.²⁶⁶

Noutro estudo, realizado nas mesmas explorações de bovinos leiteiros, mas avaliando a excreção a nível individual, por meio de testes de PCR em amostras de muco vaginal, foi

evidenciada uma associação entre o uso de antibióticos no período de secagem e a prevenção da excreção no parto. No entanto, nos animais detetados como excretadores, não se verificaram reduções significativas na carga bacteriana excretada. Adicionalmente, as proporções de animais excretadores corresponderam a 18,9% nos casos onde não foram administrados antibióticos, 16,3% em animais com uma administração de oxitetraciclina à secagem e 16,4% em animais com duas administrações de oxitetraciclina, com um intervalo de 15 dias, questionando-se a utilidade da segunda administração.²⁶⁷

Estudos farmacocinéticos realizados em ovelhas adultas, gestantes e não gestantes, demonstraram que a administração de clorotetraciclina no alimento não é um processo eficaz, uma vez que as doses máximas aprovadas não permitem atingir concentrações mínimas inibitórias, tanto no plasma dos animais adultos, como nos tecidos e plasma fetal.^{268,269} O tratamento com duas administrações de oxitetraciclina injetável no último mês de gestação também já foi proposto em caprinos, mas continuam a ser necessários mais estudos relativos à relevância desta intervenção nesta espécie.^{255,270}

Nos humanos, o tratamento recomendado em situações de febre Q aguda consiste na administração diária de 200 mg de doxiciclina, durante 14 dias, a qual demonstra propriedades farmacocinéticas superiores e menor intolerância gástrica quando comparada com as tetraciclinas.^{1,44} Em situações de complicações a longo prazo, podem ser necessários protocolos terapêuticos de 18 a 24 meses de duração, com associação de doxiciclina e hidroxiquina. Adicionalmente, em casos de intolerância ou resistência à doxiciclina, cotrimoxazol é a alternativa recomendada, assim como rifampicina, quinolonas e novos macrólidos.²⁷¹

7.2 Vacinação

As vacinas para profilaxia da coxielose variam no seu modo de preparação e composição, nomeadamente na estirpe, ou combinações de estirpes, e na fase de *C. burnetii* utilizada. Esta representa o elemento mais importante, sendo que as vacinas preparadas a partir de *Coxiella burnetii* de fase I são mais protetoras que as de fase II, em animais inoculados em laboratório.²⁴¹

Na Europa, uma vacina inativada de *C. burnetii* de fase I (Coxevac[®]) encontra-se licenciada para uso em bovinos e caprinos, sendo também muito utilizada “off-label” em ovinos, apesar da informação limitada existente no que diz respeito ao seu efeito na saúde e resposta imunitária nesta espécie.²⁷² Como tal, os vários estudos experimentais em ruminantes naturalmente infetados permitiram comprovar as vantagens da administração de vacinas de fase I, nomeadamente na prevenção de abortos, na diminuição do número de animais excretadores e na diminuição na quantidade de bactérias excretadas para o ambiente.^{241,266,267,273}

Idealmente, a vacinação dos animais deve ser implementada em explorações livres de infeção por *Coxiella burnetii*. Nas explorações infetadas, a vacinação deve ser efetuada a todos os animais presumidamente suscetíveis, nomeadamente nas novilhas, sendo particularmente recomendada nos casos em que a infeção ainda não se encontre amplamente distribuída na exploração.²⁷³ As novilhas nulíparas apresentam uma menor probabilidade de se infetarem do

que as vacas adultas, mesmo em explorações infetadas, representando uma população alvo em programas vacinais.^{14,267} A vacinação é idealmente iniciada em animais jovens, a partir dos três meses de idade, consistindo em duas administrações subcutâneas, com um intervalo de três semanas, numa dose de 4 mL para bovinos e 2 mL para caprinos, seguidas de um reforço anual. De acordo com as instruções do fabricante, a vacina deve ser administrada em animais não gestantes, sendo que a imunização inicial deve estar completa pelo menos três semanas antes de se proceder à inseminação artificial ou cobrição natural.^{255,272}

Num estudo em explorações de bovinos leiteiros, animais suscetíveis, não gestantes no momento da vacinação com Coxevac[®], demonstraram uma probabilidade cinco vezes menor de virem a tornar-se excretores, quando comparados com animais aos quais foi administrado um placebo. A nível da intensidade da excreção, não se verificaram diferenças significativas entre os dois grupos. No entanto, animais vacinados durante a gestação apresentaram uma probabilidade semelhante de se tornarem excretores, relativamente ao grupo placebo. Isto poderá ser explicado pelas alterações hormonais verificadas durante a gestação, responsáveis por algum grau de imunossupressão, especialmente pela inibição de respostas imunes pró-inflamação. Estas respostas, como é o caso da produção de interferão gama (IFN- γ), capazes de limitar a multiplicação de *C. burnetii*, apresentam uma menor expressão durante a gestação, possibilitando assim uma maior taxa de sobrevivência e multiplicação da bactéria.²⁷³ Noutro estudo, também em bovinos leiteiros, a mesma vacina não preveniu significativamente a excreção individual de *Coxiella burnetii*, mas demonstrou uma associação significativa com cargas bacterianas menores.²⁶⁷

Relativamente aos pequenos ruminantes, um estudo experimental em caprinos reportou que a administração de uma vacina de fase I em animais suscetíveis, posteriormente infetados, se associou a uma forte redução na incidência de abortos e da excreção de *C. burnetii* no leite, muco vaginal e fezes, comparativamente a animais não vacinados ou vacinados com uma vacina de fase II.²⁴¹ Adicionalmente, num estudo recente com ovelhas infetadas por volta do 100º dia de gestação, a vacinação antes da cobrição, tanto com uma vacina de fase I (Coxevac[®]), como com uma vacina experimental de fase II, evidenciou uma maior proporção de gestações normais, uma prevenção completa da excreção da bactéria no leite e nas fezes, assim como uma diminuição da excreção a nível do muco vaginal, comparativamente a animais não vacinados.²⁷⁴

Apesar de vários estudos demonstrarem a eficácia da vacina de fase I na redução da ocorrência de sinais clínicos e excreção de *C. burnetii*, é importante ter em consideração que esta não previne a infeção nem tampouco elimina a infeção em animais doentes. Adicionalmente, os dados mais recentes indicam que, aproximadamente nove meses depois da vacinação, os títulos de anticorpos gerados pela vacina parecem atingir níveis inferiores ao limiar de proteção, sendo necessário ajustar os planos vacinais em conformidade.²⁷⁵

Atualmente, no que diz respeito aos humanos, existe apenas uma vacina contra a febre Q disponível no mercado, licenciada na Austrália em 1989. A Q-VAX[®] é uma vacina inativada de fase I, de administração única, recomendada para indivíduos com mais de 15 anos de idade que demonstrem um maior risco de exposição a *C. burnetii*, com uma eficácia de 82% a 100% e uma

proteção duradoura de até 5 anos.^{44,276} No entanto, para que a vacina possa ser administrada, é necessário garantir que os indivíduos não apresentam imunidade prévia, por meio de testes intradérmicos e serológicos, de forma evitar possíveis reações locais ou efeitos secundários mais severos. Como tal, este processo é demorado e dispendioso, o que dificulta a implementação de programas vacinais de larga escala.²⁷⁷ No futuro, o desenvolvimento de testes mais rentáveis, assim como vacinas de nova geração, poderão resolver este problema.²⁷⁶

II. Estudo Experimental

8 Prevalência molecular e serológica de *Coxiella burnetii* em explorações de bovinos leiteiros em Rio Mau, Vila do Conde

8.1 Objetivos

O atual estudo teve como objetivo principal determinar a prevalência de *Coxiella burnetii* em explorações de bovinos leiteiros em Rio Mau, Vila do Conde. Adicionalmente, procurou-se avaliar possíveis fatores de risco de ocorrência da doença.

8.2 Material e métodos

8.2.1 Caracterização da área em estudo e seleção do número de explorações

Rio Mau é uma antiga freguesia portuguesa do concelho de Vila do Conde, com uma área de 9,88 km², 1862 habitantes (2011) e uma densidade populacional de 188,5 habitantes por km². Atualmente, integra a União de Freguesias de Rio Mau e Arcos, sendo que esta apresenta uma área de 15,7 km², com 2681 habitantes e uma densidade populacional de 170,8 habitantes por km².²⁷⁸

Para obtenção do número total de explorações de bovinos leiteiros em Rio Mau, foi consultado o mapa de explorações e efetivos bovinos por freguesia do Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (SNIRA), a 22 de novembro de 2022, tendo sido verificada a existência de um total de 26 explorações leiteiras na região. Todos os produtores foram contactados quanto à sua disponibilidade para participar no presente estudo, conseguindo-se a participação de 25 das 26 explorações elegíveis, correspondente a uma taxa de participação de 96,2%.

8.2.2 Recolha das amostras de leite do tanque

As amostras foram recolhidas entre 25 de janeiro e 8 de fevereiro de 2023 pelo autor da presente dissertação, com o acompanhamento de um colaborador da Cooperativa Agrícola de Vila do Conde (CAVC). Todas as colheitas foram efetuadas com luvas descartáveis para tubos de ensaio estéreis sem EDTA, devidamente identificados, e posteriormente processadas pelo laboratório Lab4gene, localizado na Maia, Porto.

8.2.3 Inquérito aos produtores

A cada produtor foi pedido que respondesse a um breve inquérito elaborado com base nas condições gerais da exploração e saúde do efetivo, medidas de biossegurança instituídas e grau de conhecimento dos próprios produtores relativamente à febre Q, o qual se encontra em anexo (Tabela 20).

Todos os inquéritos foram realizados pelo autor do presente estudo, tendo sido realizados, maioritariamente, de forma presencial, no momento da recolha da amostra de BTM. No entanto, nos casos em que os produtores se viram impossibilitados de responder às questões no momento da recolha, estas foram efetuadas por chamada telefónica durante o mês de fevereiro de 2023.

8.2.4 Testes estatísticos

A análise estatística foi efetuada com recurso ao software estatístico IBM® SPSS®, Versão 28.

Procedeu-se à análise descritiva gráfica e tabelar de variáveis quantitativas, com valores mínimos, valores máximos, média (M), desvio padrão (DP) e percentis, assim como variáveis qualitativas, com frequências absolutas e relativas.

Realizaram-se testes de comparação de médias entre duas amostras independentes sobre variável dependente de tipo quantitativo, com o teste paramétrico T a ser utilizado para amostras independentes no caso de satisfação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando isso não se verificou, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para consulta destes dados, deve verificar-se as Tabelas 20 e 21, em anexo.

Relativamente à associação entre variáveis qualitativas, recorreu-se ao teste do qui-quadrado (χ^2). Foram também efetuadas regressões de Poisson e teste de Wald para validação de significância da razão de prevalência (RP) entre duas amostras.

8.2.5 Testes laboratoriais

8.2.5.1 PCR

No presente estudo foi utilizado o *VetMAX™ C. burnetii Absolute Quant Kit*, produzido pela *Thermo Fisher Scientific*, que se caracteriza como um método de diagnóstico molecular para deteção específica de *Coxiella burnetii* por PCR em tempo real, a partir de esfregaços vaginais, cervicais ou placentários, leite, muco vaginal, fluido amniótico e tecidos fetais de ruminantes.

8.2.5.1.1 Realização do teste

Para a extração do DNA de *C. burnetii*, foi utilizado o *MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit*, com recurso ao equipamento *ZIXpress®*, validado pelo fabricante para os protocolos *MagMAX™*, seguindo as seguintes etapas:

- 1) Preparação das placas de processamento.
 - Adicionar 500µL/poço de solução de lavagem *MagMAX™ CORE 1* na segunda posição da placa.
 - Adicionar 500µL/poço de solução de lavagem *MagMAX™ CORE 2* na terceira posição da placa.
 - Adicionar 90µL/poço de solução tampão de eluição *MagMAX™ CORE* na quarta posição da placa.
 - Colocar um pente de pontas na quinta posição da placa.
- 2) Preparação de uma mistura composta por uma solução de lise, uma solução ligante e esferas magnéticas, para um volume total de 720 µL por amostra.
 - Adicionar 350 µL de solução de lise *MagMAX™ CORE*.
 - Adicionar 350 µL de solução ligante *MagMAX™ CORE*.
 - Adicionar 20 µL de esferas magnéticas.
- 3) Preparação da solução de proteinase K (PK).
 - Adicionar 90 µL de tampão *MagMAX™-96 DNA Multi-Sample Kit*.
 - Adicionar 10 µL de proteinase K *MagMAX™ CORE*.
- 4) Preparação de 200 µL de amostra.
- 5) Combinação das amostras com a solução PK e com a mistura obtida no segundo ponto.
 - Transferir 200 µL de cada amostra para os respetivos poços na placa.
 - Adicionar 100 µL de solução PK e misturar devidamente, pipetando para cima e para baixo.
 - Incubar 30 a 45 minutos à temperatura ambiente, mantendo a placa agitada a movimentos lentos ou médios.
 - Ressuspender completamente a mistura obtida no segundo ponto e adicionar 720 µL a cada poço com amostras.
 - Iniciar imediatamente o processamento das amostras, selecionando o *script MagMAX_CORE_Flex.bdz*. e colocando as placas quando indicado pelo equipamento.

Após a extração do DNA, deve proceder-se à sua amplificação. Neste estudo, o equipamento utilizado para o efeito foi o *Quant Studio™ 5*, produzido pela *Thermo Fisher Scientific*.

O *VetMAX™ C. burnetii Absolute Quant Kit* contém também um controlo positivo de amplificação (EPC), previamente extraído, que permite a validação da amplificação de DNA bacteriano. Um resultado positivo dentro do intervalo de Ct definido, permite validar a

amplificação do alvo de *Coxiella burnetii* durante o PCR em tempo real. A validação da extração de ácidos nucleicos é feita pela detecção de um IPC endógeno, presente em todas as amostras. Um IPC positivo numa amostra valida a extração, para essa mesma amostra, independentemente do resultado obtido relativamente à presença de *C. burnetii*, eliminando possíveis falsos negativos.

São ainda realizados dois controlos negativos, nomeadamente um controlo negativo de extração (NCS) e um controlo negativo de amplificação (NC). O NCS consiste em reagentes usados na extração dos ácidos nucleicos, sem a adição de uma amostra, os quais são submetidos ao mesmo processamento que as restantes amostras. O NC consiste em 20 µL da mistura de PCR em tempo real e 5 µL de água livre de DNase/RNases. Um resultado negativo para *Coxiella burnetii* e para o IPC nestes controlos permite, então, confirmar a ausência de contaminações durante os processos de extração e amplificação do DNA.

O volume total utilizado na reação de PCR em tempo real, para cada amostra, é de 25 µL, correspondendo a 5 µL de DNA extraído e 20 µL de mistura de PCR, sendo esta constituída pelos *primers*, pelos sistemas de detecção do alvo de *Coxiella burnetii* e do IPC, pelo tampão e a enzima de PCR, assim como uracil-N-glicosilase.

Após a preparação da mistura de reação, deve iniciar-se o procedimento de amplificação por PCR em tempo real, respeitando as seguintes etapas:

- 1) Configuração dos detetores no termociclador.
- 2) Atribuição do detetor para *Coxiella burnetii* e do detetor para o IPC a cada poço com amostras em análise.
- 3) Atribuição do valor de quantificação para controlo da amplificação ($3,00 \times 10^5$ cópias do genoma/mL).
- 4) Escolha do programa a instituir, representado na Tabela 11.
- 5) Colocação da placa no termociclador, podendo dar-se início à reação.

Tabela 11 - Passos da amplificação de DNA pelo PCR em tempo real. ⁽¹⁾: A recolha da informação relativa à fluorescência é efetuada nesta fase.

Passo	Repetições	Temperatura	Duração
1	1x	50°C	2 minutos
2	1x	95°C	10 minutos
3	45x	95°C	15 segundos
		60°C ⁽¹⁾	1 minuto

8.2.5.1.2 Validação e interpretação dos resultados.

Relativamente aos testes de natureza qualitativa, estes são válidos quando se verificam os critérios representados na Tabela 12.

Tabela 12 - Critérios de validação do teste de PCR em tempo real. ⁽¹⁾: Referente aos valores listados na secção 2.1 “EPC” do Certificado de Análise para o lote utilizado no teste; ⁽²⁾: O valor do IPC no EPC não deve ser utilizado para validação do teste.

	Detetor de <i>C. burnetii</i>	Detetor do IPC	Validação
EPC	Ct = ⁽¹⁾	Ct < 45 ou Ct > 45 ⁽²⁾	PCR validado
NCS	Ct > 45	Ct > 45	Extração validada
NC	Ct > 45	Ct > 45	Componentes do PCR validados

Para cada amostra analisada, os resultados devem ser interpretados de acordo com o descrito na Tabela 13.

Tabela 13 - Interpretação dos resultados do PCR em tempo real.

Detetor de <i>C. burnetii</i>	Detetor do IPC	Interpretação
Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45	<i>Coxiella burnetii</i> detetada
Ct > 45	Ct < 45	<i>Coxiella burnetii</i> não detetada
Ct > 45	Ct > 45	Teste inválido

8.2.5.2 ELISA

O ELISA utilizado no presente estudo foi o *PrioCHECK™ Ruminant Q fever Ab Plate Kit*, produzido pela *Thermo Fisher Scientific*, que se caracteriza como um teste imunoenzimático para deteção específica de anticorpos anti-*Coxiella burnetii* em amostras de soro ou leite de ruminantes. Neste teste, são utilizados antígenos de fase I e de fase II de uma estirpe de *Coxiella burnetii* responsável por abortos em ovinos.

8.2.5.2.1 Realização do teste

Para a realização do teste ELISA, todos os reagentes devem ser colocados à temperatura ambiente (21±4°C) antes de se iniciar o procedimento, sendo recomendado o uso de recipientes descartáveis para se distribuírem todos os componentes necessários. Estando reunidas todas as condições, devem seguir-se então as seguintes etapas:

- 1) Distribuição dos controlos e das amostras.
 - Adicionar 5µL de controlo negativo aos poços A1 e B1.
 - Adicionar 5µL de controlo positivo aos poços C1 e D1.
 - Adicionar 5µL de cada BTM aos restantes poços.
 - Adicionar 95µL de solução tampão a todos os poços que contenham controlos ou amostras de BTM.
 - Colocados todos os reagentes, deve agitar-se gentilmente, cobrir a placa e incubar durante 16 a 18 horas a 5±3°C.
- 2) Lavagem.
 - A placa deve ser esvaziada e lavada três vezes com 300µL de solução de lavagem por poço.

- De seguida, deve eliminar-se quaisquer vestígios de líquidos com papel absorvente, evitando a secagem dos poços.
- 3) Distribuição dos conjugados.
 - Adicionar 100µL da solução de conjugado a cada poço.
 - Agitar gentilmente, cobrir e incubar a placa durante uma hora a 37±2°C.
 - 4) Lavagem.
 - Repetir o procedimento de lavagem previamente descrito.
 - 5) Desenvolvimento do teste.
 - Adicionar 100µL de substrato a cada poço.
 - Agitar gentilmente a placa durante dois segundos.
 - Incubar por dez minutos a 21±4°C em escuridão, sem cobrir a placa.
 - Adicionar 100µL da solução de paragem a cada poço, na mesma ordem pela qual foi adicionada o substrato.
 - Agitar gentilmente a placa durante dois segundos.
 - 6) Leitura das amostras.
 - Secar o fundo da placa com um tecido macio, de forma a remover qualquer partícula de pó.
 - Proceder à leitura da placa no espectrofotómetro, a um comprimento de onda de 450 nm, num período máximo de 30 minutos após o término da reação.

8.2.5.2.2 Cálculo, validação e interpretação dos resultados

Para se proceder à interpretação dos resultados, é calculada a densidade ótica (OD) média do controlo positivo (OD_{m PC}) e do controlo negativo (OD_{m NC}). Obtida a densidade ótica da amostra (OD_{amostra}), procede-se ao cálculo do rácio amostra/positivo (S/P), para cada uma das amostras, através da fórmula:

$$S/P = \frac{OD_{amostra} - OD_{m NC}}{OD_{m PC} - OD_{m NC}}$$

O valor do título, por sua vez, é calculado da seguinte forma:

$$Título = S/P * 100$$

Adicionalmente, deve ter-se em consideração que, no caso de amostras negativas, o valor de S/P poderá ser inferior a zero.

Relativamente à validação do teste, este só é válido caso se verifiquem duas situações:

$$ODm\ PC > 0,400 \quad e \quad \frac{ODm\ PC}{ODm\ NC} > 2$$

De acordo com o fabricante, para cada amostra, o resultado pode ser classificado como negativo, positivo fraco (Pos +), positivo médio (Pos ++) e positivo forte (Pos +++) consoante o valor do título, tal como consta na Tabela 14.

Tabela 14 - Interpretação dos resultados obtidos após análise das amostras de BTM pelo teste PrioCHECK™ Ruminant Q fever Ab Plate Kit.

Resultado	Interpretação
Título ≤ 30	Negativo
30 < Título ≤ 100	Pos +
100 < Título ≤ 200	Pos ++
Título > 200	Pos +++

8.3 Resultados

8.3.1 Dados obtidos nos inquéritos

8.3.1.1 Condições gerais da exploração e saúde do efetivo

No que diz respeito à área coberta das 25 explorações que integram o estudo, esta variou entre 200m² e 6000m², com $M \pm DP = 2,032 \pm 1468,69$ m², sendo que 25% das explorações apresentam um valor até 1100m², 50% até 1500m² e 75% até 1750m². Das 25 explorações, sete apresentam um valor de área coberta fora da tipicidade da amostra, com quatro explorações entre 3500m² e 3750m², uma com 5000m² e outra com 6000m².

Quanto ao número total de animais do efetivo, este oscilou entre 30 e 420, com uma $M \pm DP = 184 \pm 115,15$ animais por exploração, verificando-se que 25% das explorações detêm até 105 animais, 50% até 145 e 75% até 257. O efetivo total das 25 explorações correspondeu a 4599 animais, dos quais 2292 vacas em lactação, no momento da recolha das amostras de BTM.

A densidade animal oscila entre 19,2 e 190,0 animais por km² de área coberta, com $M \pm DP = 108,8 \pm 46,30$ animais por km². Das 25 explorações, 25% apresenta uma densidade animal até 79,2 animais/km², 50% até 113,5 e 75% até 136,2.

O número de vacas em lactação varia entre 13 e 240, com $M \pm DP$ de $91,7 \pm 58,38$ por exploração, sendo que 25% das explorações apresenta até 48, 50% até 80 e 75% até 123 animais lactantes. Uma das explorações apresentou um valor díspar do padrão da amostra, com 240 vacas em lactação.

No Gráfico 1 encontra-se apresentada a distribuição das explorações consoante as características previamente referidas.

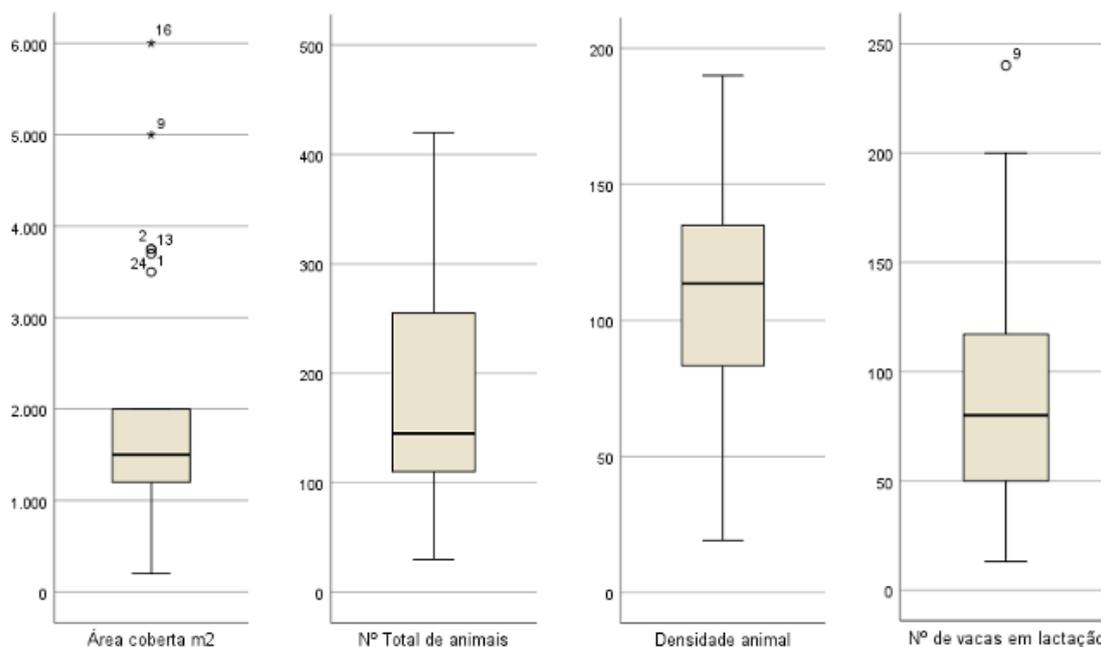


Gráfico 1 - Distribuição das explorações por área coberta, número total de animais, densidade animal e número de vacas em lactação (n=25).

A nível de fertilidade, a média de IA/CN por animal para que se atinja uma gestação variou entre 1,2 e 3,4, a nível de exploração, com $M \pm DP = 2,0 \pm 0,47$. Observou-se que 25% das explorações apresentam uma média de até 1,7 IA/CN por animal, 50% até 2,0 e 75% até 2,2. Sete explorações distinguiram-se do padrão da amostra, das quais duas se encontraram abaixo da tipicidade, com médias de 1,2 e 1,4 IA/CN por animal, e cinco acima, com três explorações a demonstrarem médias de 2,5 IA/CN por animal, uma com 2,6 e outra com 3,4.

Relativamente à taxa anual de mastites, esta oscilou entre 7,1% e 94,3%, com $M \pm DP$ de $28,2 \pm 22,70$ %. Os resultados indicam que 25% das explorações apresenta uma taxa de até 10,7%, 50% até 24,9% e 75% até 36,5%, destacando-se duas explorações com taxas acima da tipicidade da amostra, com valores de 85,7% e 94,3%.

A taxa anual de RMF, metrites e endometrites apresentou-se entre 3,0% e 54,5%, com $M \pm DP = 18,8 \pm 15,29$ % ($DP=15,29\%$). Verificou-se que 25% das explorações apresenta uma taxa de até 6,9%, 50% até 16,1% e 75% até 23,7%. Observam-se três explorações com taxas acima da tipicidade da amostra, com valores entre 51,4% e 54,5%.

Por fim, no que diz respeito à taxa anual de abortos, esta variou entre 0,5% e 22,3%, com $M \pm DP = 4,6 \pm 4,45$ % ($DP=4,45$). Observou-se que 25% das explorações apresentam uma taxa de até 1,7%, 50% até 3,7% e 75% até 6,0%. Duas das explorações demonstraram taxas de aborto superiores à tipicidade da amostra, com valores de 12,6% e 21,3%.

No Gráfico 2, encontra-se apresentada a distribuição das explorações relativamente a estas características.

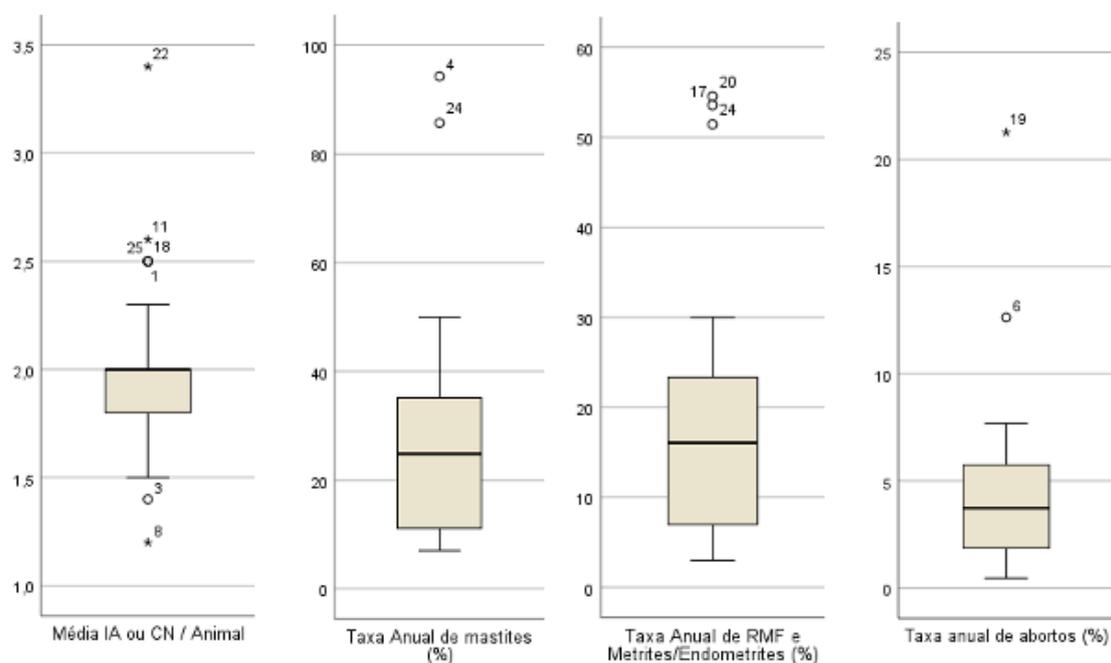


Gráfico 2 - Distribuição das 25 explorações por média de IA ou CN por animal, taxa anual de mastites, taxa anual de RMF e metrites/endometrites e taxa anual de abortos (n=25).

Por sua vez, na Tabela 15 encontram-se descritos todos os fatores avaliados relativamente às condições gerais das explorações e saúde dos efetivos.

Tabela 15 - Caracterização das 25 explorações a nível de condições gerais e saúde dos efetivos. ^a: animais/km²; ^b: sem informação de uma das explorações; Min-Máx: valor mínimo e máximo; P₂₅, P₅₀ e P₇₅: valor máximo verificado em 25%, 50% e 75% das explorações, respetivamente.

Fator	Min - Máx	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅	Média	DP
Área coberta (m ²)	200 - 6000	1100	1500	1750	2032	1468,69
Nº total de animais	30 - 420	105	145	257	184	115,15
Densidade animal ^a	19,2 - 190,0	79,2	113,5	136,3	108,8	43,30
Nº de vacas em lactação	13 - 240	48	80	123	91,7	58,38
Média de IA/CN por animal	1,2 - 3,4	1,7	2,0	2,2	2,0	0,47
Taxa anual de mastites (%) ^b	7,1 - 94,3	10,7	24,9	36,5	28,2	22,70
Taxa anual de RMF/Metrites/Endometrites (%) ^b	3,0 - 54,5	6,9	16,1	23,7	18,8	15,29
Taxa anual de abortos (%)	0,5 - 21,3	1,7	3,7	6,0	4,6	4,45

8.3.1.2 Condições de biossegurança da exploração

Das 25 explorações, 18 (72,0%) apresentam o seu perímetro vedado em toda a sua extensão (Gráfico 3), com 52,0% da totalidade da amostra a reportar contacto de cães e/ou gatos com os animais da exploração (Gráfico 4). Adicionalmente, 48,0% das explorações declarou a possibilidade do contacto destas espécies com os locais de armazenamento de alimento e material para as camas (Gráfico 5).

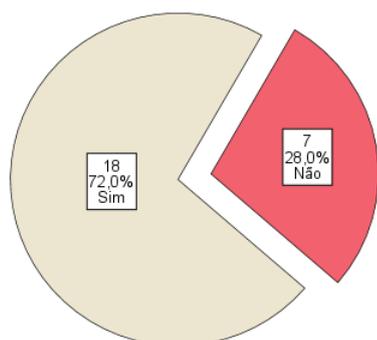


Gráfico 4 - Explorações com perímetro vedado em toda a sua extensão (n=25).

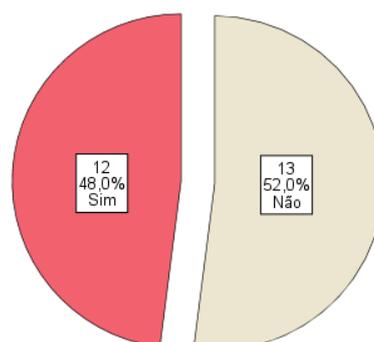


Gráfico 3 - Explorações com contacto de cães e gatos com os animais da exploração (n=25).

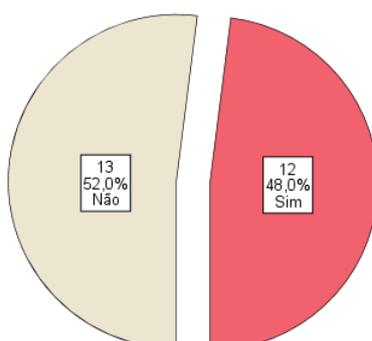


Gráfico 5 - Explorações com contacto de cães e gatos com os locais de armazenamento do alimento e material para as camas (n=25).

Em 19 explorações (76,0%), verifica-se a existência de um local onde são separados os animais peri-parturientes do restante efetivo e onde ocorrem os partos, comumente designado de maternidade (Gráfico 6). Destas 19, apenas 14 (73,7%) realizam uma desinfeção regular deste local (Gráfico 7), com o uso de cal viva a ser reportado em 57,1% das explorações, lixívia em 21,4% e carbonato de cálcio e *Virocid*TM em 14,3% (Gráfico 8). Adicionalmente, 63,2% das explorações que possuem maternidade utilizam o estrume obtido neste local para fertilizar os campos (Gráfico 9).

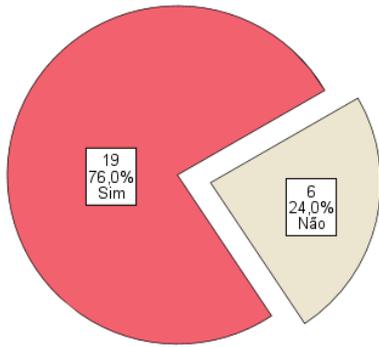


Gráfico 7 - Explorações que apresentam uma maternidade (n=25).

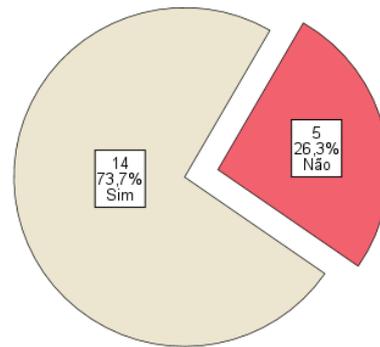


Gráfico 6 - Explorações que desinfetam regularmente a maternidade (n=19).

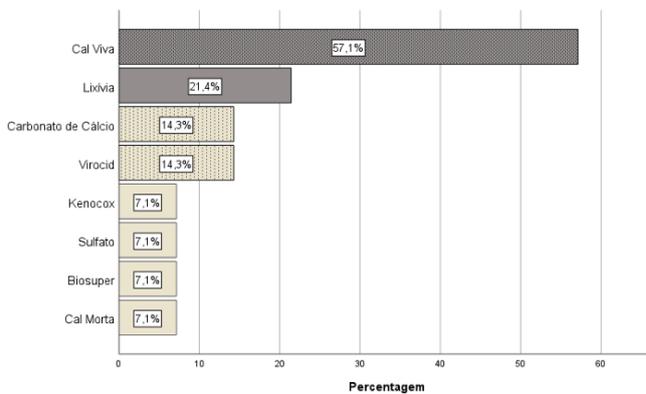


Gráfico 9 - Desinfetantes utilizados na maternidade (n=19).

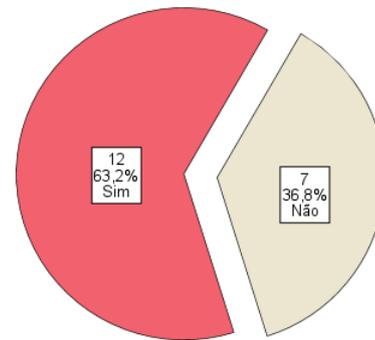


Gráfico 8 - Explorações que utilizam o estrume da maternidade nos campos (n=19).

Das 22 explorações (88,0%) que utilizam os chorumes nos seus campos, apenas uma reportou a realização de um tratamento prévio, não especificando, no entanto, o protocolo implementado antes da sua aplicação. As três explorações restantes (12,0%) não fazem uso próprio destes resíduos (Gráfico 10).

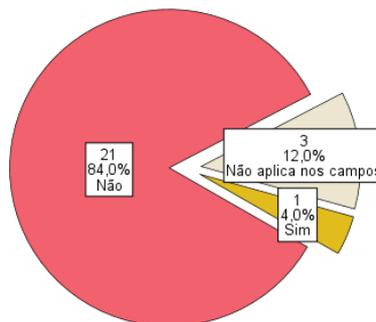


Gráfico 10 - Explorações que aplicam ou não algum tratamento aos chorumes antes de os aplicar nos campos (n=25).

Relativamente aos produtos resultantes dos partos, a maioria das explorações (96,0%) indicou a fossa como o seu destino, com apenas uma exploração (4,0%) a declarar que procede

a enterrá-los (Gráfico 11). Quanto à manipulação destes produtos, 80,0% dos produtores utiliza sempre luvas descartáveis, 92,0% utilizam bata ou fato macaco e 100% faz uso de galochas (Gráficos 12 e 13). No entanto, 76,0% produtores também reportou utilizar o mesmo equipamento noutras áreas da exploração, excetuando o material descartável (Gráfico 14). Adicionalmente, nenhuma das explorações reportou o uso de máscara.

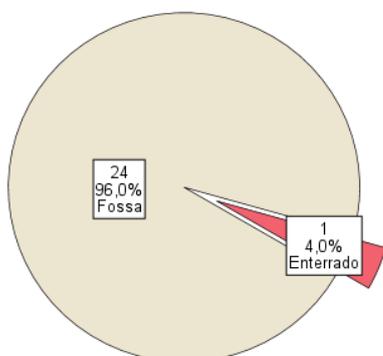


Gráfico 11 - Destino dos produtos de parto (n=25).

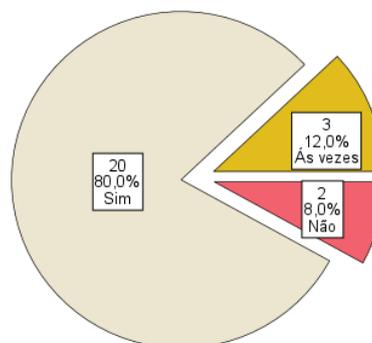


Gráfico 13 - Uso de luvas descartáveis na manipulação dos produtos de parto (n=25).

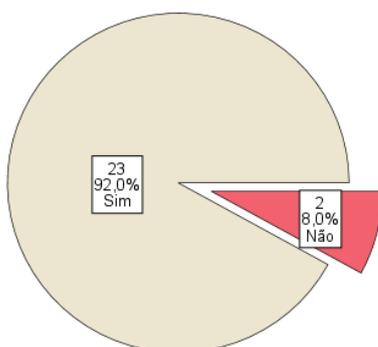


Gráfico 12 - Uso de bata na manipulação dos produtos de parto (n=25).

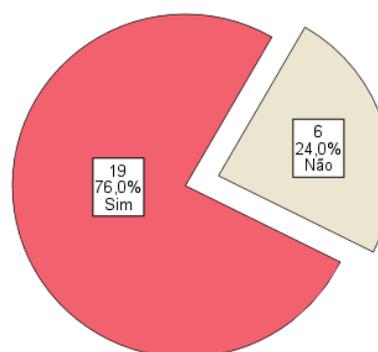


Gráfico 14 - Explorações que utilizam o equipamento de proteção individual, usado na manipulação dos produtos de parto, noutras áreas da exploração (n=25).

Em 20 explorações (80,0%) é praticada a desparasitação externa dos animais (Gráfico 15), com 65,0% destas a realizar o procedimento uma vez ao ano, comparativamente aos restantes 35,0%, onde se realizam duas desparasitações anuais (Gráfico 16).

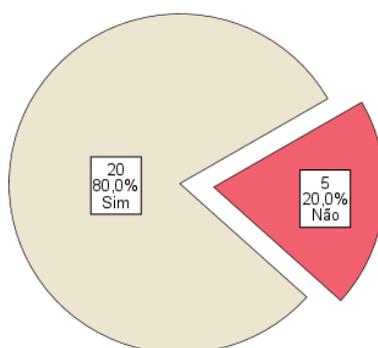


Gráfico 16 - Explorações que desparasitam externamente os animais (n=25).

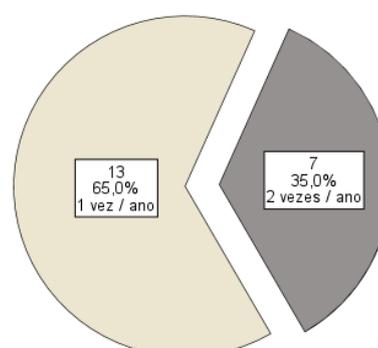


Gráfico 15 - Frequência da desparasitação (n=20).

No seguimento de uma visita à exploração, apenas uma exploração (4,0%) fornece vestuário próprio aos visitantes, com as restantes 24 (96,0%) a declarar não fornecer qualquer tipo de material de proteção da própria exploração (Gráfico 17).

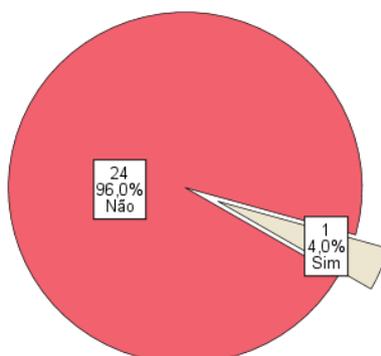


Gráfico 17 - Fornecimento de vestuário próprio da exploração aos visitantes (n=25).

Genericamente é realizada uma desinfeção regular das instalações, sendo que 28,0% das explorações apenas o faz quando considera necessário (Gráfico 18).

Por fim, 17 explorações (68,0%) não adquiriram recentemente animais, com apenas 8 (32,0%) a reportar a compra de novos animais a outras explorações, nos cinco anos anteriores à realização do inquérito (Gráfico 19).

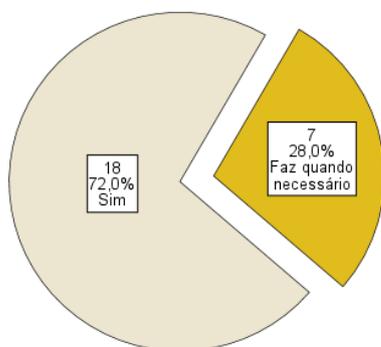


Gráfico 19 - Explorações que realizam uma desinfeção regular das instalações (n=25).

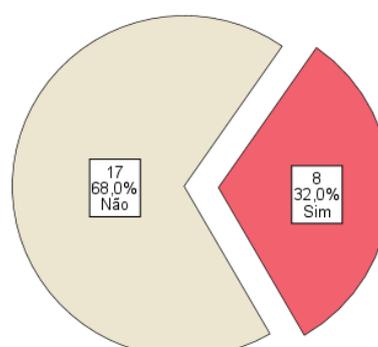


Gráfico 18 - Explorações que adquiriram novos animais nos últimos cinco anos (n=25).

8.3.1.3 Grau de conhecimento em relação à febre Q

Relativamente ao conhecimento da doença, apenas 8 produtores (32,0%) declararam ter conhecimento da existência da febre Q, desconhecendo, no entanto, a sua expressão nos humanos e nos animais (Gráfico 20). Quando questionados relativamente ao carácter zoonótico da doença, apenas um produtor (4,0%) declarou conhecer o significado do termo “zoonose” e, consequentemente, que a febre Q integra a lista de zoonoses conhecidas (Gráfico 21).

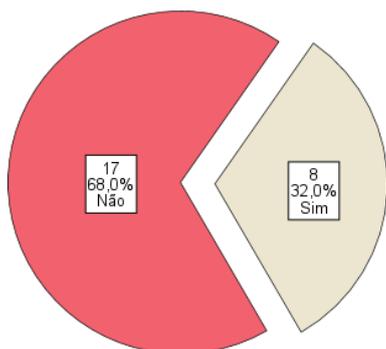


Gráfico 21 - Produtores que afirmam ter algum conhecimento relativamente à febre Q (n=25).

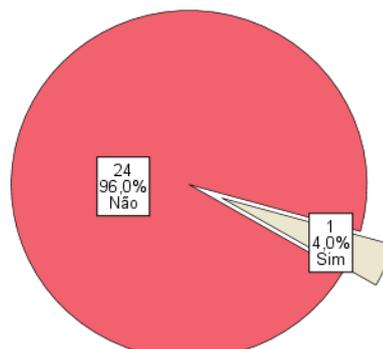


Gráfico 20 - Produtores que estão familiarizados com o termo "zoonose" e que reconhecem a febre Q como uma zoonose (n=25).

Das 25 explorações, apenas duas (8,0%) demonstraram um historial prévio de infeção por *C. burnetii*. Uma das explorações declarou não ter conhecimento de casos positivos desde 2021, com a outra a informar que os últimos casos conhecidos precedem a última década.

De forma a permitir uma melhor interpretação dos testes laboratoriais, os produtores foram questionados relativamente à vacinação contra a coxielose, não se verificando esta prática em nenhuma das explorações.

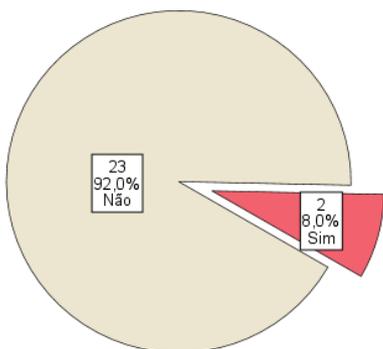


Gráfico 22 - Explorações com historial de casos de febre Q (n=25).

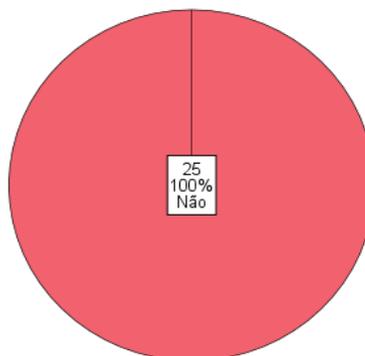


Gráfico 23 - Explorações que vacinam os animais contra a coxielose (n=25).

8.3.2 Resultado dos testes de PCR e ELISA

A nível dos testes laboratoriais, o teste de PCR detetou a presença de DNA de *C. burnetii* em amostras de BTM de 14 explorações (56,0%), verificando-se valores de Ct entre 35,8 e 40,2, com 25% das explorações a apresentar um Ct de até 37,0, 50% até 37,3 e 75% até 39,4. As proporções de resultados positivos e negativos no PCR não se revelaram estatisticamente diferentes, não se podendo afirmar que exista uma tendência de positividade/não positividade para a presença de *Coxiella burnetii* na amostra ($X^2=0,360$; $p=0,690$).

O teste de ELISA evidenciou a presença de Ac específicos para *C. burnetii* em 17 explorações (68,0%), com títulos de 37,0 até valores superiores a 200. As proporções dos

resultados positivos e negativos no ELISA também não se revelaram estatisticamente diferentes, não se podendo afirmar que exista uma tendência de positividade/não positividade para a presença de Ac anti-*C. burnetii* na amostra ($X^2=3,240$; $p=0,108$).

Nos Gráficos 24 e 25, encontram-se representados os resultados obtidos nos testes de PCR e ELISA, respetivamente.

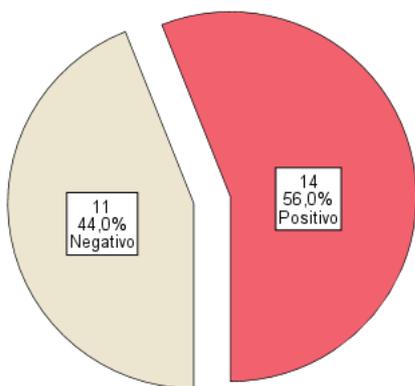


Gráfico 25 - Resultados obtidos após a análise das amostras de BTM no teste de PCR (n=25).

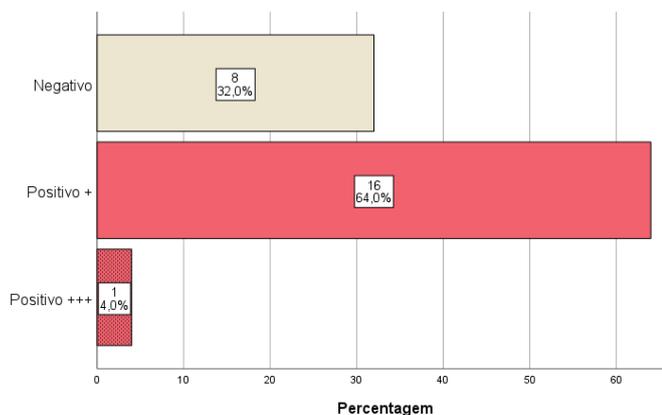


Gráfico 24 - Resultados obtidos após a análise das amostras de BTM no teste de ELISA (n=25).

No Gráfico 26, é apresentada a distribuição do cruzamento dos resultados obtidos pelos testes de PCR e ELISA para cada exploração. É possível observar que 16,0% das explorações revelaram negatividade nos dois testes realizados, 28,0% mostraram-se negativas ao PCR, mas positivas para ELISA, e 16,0% positivas ao teste de PCR e negativas no ELISA. Por sua vez, dez das explorações (40,0%) apresentaram positividade tanto para o PCR como para o ELISA. No entanto, estes resultados não se apresentam estatisticamente significativos, não se podendo afirmar que há uma tendência para as explorações serem positivas para PCR e ELISA ($X^2=3,960$; $P=0,286$).

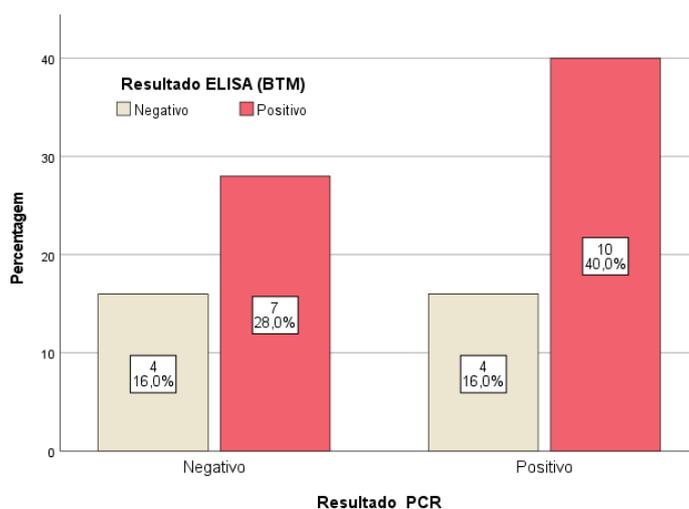


Gráfico 26 - Cruzamento dos resultados obtidos nos testes de PCR e ELISA em cada exploração (n=25).

Na Figura 11 é possível observar a distribuição das explorações na região de Rio Mau, consoante os resultados obtidos em ambos os testes laboratoriais.

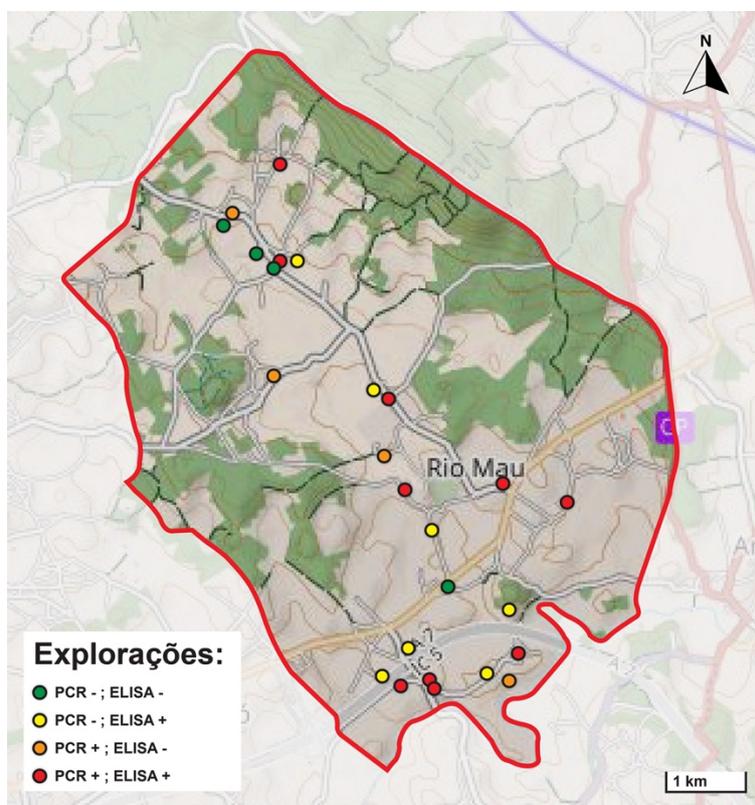


Figura 11 - Distribuição das explorações de bovinos leiteiros participantes no presente estudo, consoante o resultado da análise das amostras de BTM, na região de Rio Mau, Vila do Conde.

8.3.3 Relação dos indicadores da exploração com os testes laboratoriais

8.3.3.1 Indicadores x PCR

Relativamente às condições gerais das explorações e saúde dos efetivos, e de acordo com os resultados apresentados na Tabela 16, genericamente, as explorações positivas para o PCR apresentaram valores mais elevados a nível de número total de animais (Média (M) \pm DP=193,3 \pm 117,28), densidade animal (M \pm DP=116,2 \pm 50,58), número de vacas em lactação (M \pm DP=60,43), média de IA+CN/animal (M \pm DP=2,1 \pm 0,55), taxa anual de mastites (M \pm DP=35,4 \pm 27,36 %) e taxa anual de RMF e metrites/endometrites (M \pm DP=20,4 \pm 15,95), comparativamente às explorações negativas. No entanto, relativamente à taxa anual de abortos, as explorações PCR negativas apresentaram valores superiores (M \pm DP=4,9 \pm 5,89 %).

Apesar das diferenças verificadas entre explorações positivas e negativas para o PCR, estas não se apresentam estatisticamente significativas, não havendo evidências que os fatores previamente referidos tenham demonstrado uma associação com positividade para este teste laboratorial ($p > 0,05$). A análise da razão de prevalência para cada um dos indicadores reforça que não se verificou um impacto significativo destes na prevalência de DNA de *C. burnetii* na amostra, com nenhuma a emergir como estatisticamente significativa ($p > 0,05$). No entanto, a

média de IA/CN por animal representa o indicador que apresentou maior efeito, sendo que a cada aumento de uma unidade na média de IA/CN por animal, se verifica um aumento de 12,7% (RP=1,127; p=0,726) na prevalência de positividade para o PCR. Adicionalmente, por cada aumento de 1% na taxa anual de abortos, a prevalência de PCR positivo diminui 0,4% (RP=0,996; p=0,907).

Tabela 16 - Resultados do PCR em função das condições gerais das explorações e saúde dos efetivos.
^a: Estatística e valor-p do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Indicador	PCR	n	Média ± DP	t	p	RP	Wald X ² p
Nº total de animais	-	11	172,1 ± 116,90	68,500 ^a	0,658	1,000	0,853
	+	14	193,3 ± 117,28				
Densidade animal	-	11	99,4 ± 40,54	-0,899	0,378	1,001	0,714
	+	14	116,2 ± 50,58				
Nº de vacas em lactação	-	11	89,4 ± 58,51	-0,172	0,865	1,000	0,943
	+	14	93,5 ± 60,43				
Média IA/CN por animal	-	11	1,9 ± 0,34	-0,858	0,400	1,127	0,726
	+	14	2,1 ± 0,55				
Taxa anual de mastites (%)	-	11	19,7 ± 11,75	44,500 ^a	0,122	1,005	0,488
	+	13	35,4 ± 27,36				
Taxa anual de RMF e metrites/endometrites (%)	-	11	17,0 ± 15,01	65,000 ^a	0,722	1,002	0,825
	+	13	20,4 ± 15,95				
Taxa anual de abortos (%)	-	11	4,9 ± 5,89	68,500 ^a	0,657	0,996	0,907
	+	14	4,4 ± 3,14				

Na Tabela 17, encontram-se descritos os resultados do PCR em função das condições de biossegurança das explorações.

Da sua leitura descritiva, observou-se uma maior prevalência de PCR positivo em explorações que reportaram a existência de contacto de cães e gatos com os animais da exploração (66,7%) face àquelas onde isso não se verifica (46,7%). Quanto ao contacto de cães e gatos com os locais de armazenamento do alimento e material para as camas, não se verificaram diferenças a nível de proporção de explorações positivas, ainda que a prevalência de PCR positivo tenha sido ligeiramente superior nos casos onde ocorre esse contacto.

As explorações que desparasitam os seus animais apenas uma vez por ano também demonstraram uma prevalência de PCR positivo superior (61,5%), comparativamente a explorações onde é feita uma desparasitação bianual (42,9%).

Nas explorações que indicaram a presença de uma maternidade, a prevalência de PCR positivo mostrou-se superior nas explorações onde se procede à desinfeção regular deste local (64,3%), face às explorações que não o fazem regularmente (40,0%).

Apesar das diferenças descritas anteriormente, pela presença/ausência dos fatores indicados, estas não se revelam estatisticamente significativas, podendo afirmar-se que não existem evidências de relação entre a positividade ao teste de PCR e a presença dos fatores em estudo ($p > 0,05$).

No entanto, considerou-se pertinente comentar as razões de prevalência de PCR positivo por fator em estudo, estatística obtida através da técnica de regressão de Poisson por estimação robusta. A condição do fator com menor prevalência foi considerada como a categoria de referência a comparar, observando-se que a prevalência de PCR positivo foi:

- 14,0% superior nas explorações em que há contacto de cães e gatos com os animais da exploração, em relação às explorações em que esse contacto não se verifica (RP=1,140; $p=0,682$);
- 13,1% superior nas explorações que os animais são desparasitados apenas uma vez por ano, em relação às explorações que os desparasitam bianualmente (RP=1,131; $p=0,749$);
- 17,3% superior nas explorações que desinfetam regularmente a maternidade, em relação às explorações que não o fazem (RP=1,173; $p=0,711$);
- 28,6% superior nas explorações que apenas procedem à desinfeção das instalações quando necessário, face às explorações que o fazem regularmente (RP=1,286; $p=0,459$).

É importante referir que nenhuma das relações de prevalência se demonstrou estatisticamente significativa.

Tabela 17 - Resultados do PCR em função das condições de biossegurança das explorações.
^a: Categoria de referência; NA: Não aplica; QN: Quando necessário.

Indicador		Resultado do PCR					X ²	p	RP	Wald X ² p
		Total	-		+					
		N	n	%	n	%				
Exploração com perímetro vedado em toda a extensão	Não	7	3	42,9	4	57,1	0,005	1,000	1,010	0,977
	Sim ^a	18	8	44,4	10	55,6				
Contacto de cães e gatos com os animais da exploração	Não ^a	13	7	53,8	6	46,2	1,066	0,428	1,140	0,682
	Sim	12	4	33,3	8	66,7				
Contacto de cães e gatos com locais de armazenamento de alimento e material para as camas	Não ^a	13	6	46,2	7	53,8	0,051	1,000	1,029	0,928
	Sim	12	5	41,7	7	58,3				
Existência de maternidade	Não ^a	6	3	50,0	3	50,0	0,115	1,000	1,053	0,893
	Sim	19	8	42,1	11	57,9				
Desinfecção regular da maternidade (n=19)	Não ^a	5	3	60,0	2	40,0	0,891	0,603	1,173	0,711
	Sim	14	5	35,7	9	64,3				
Utiliza o estrume da maternidade nos campos (n=19)	Não ^a	7	3	42,9	4	57,1	0,003	1,000	1,008	0,984
	Sim	12	5	41,7	7	58,3				
Chorume é tratado antes da aplicação nos campos	Não	21	9	42,9	12	57,1	1,422	0,763	1,061	0,902
	Sim ^a	1	1	100,0	0	0,0				
	NA	3	1	33,3	2	66,7				
O equipamento de proteção utilizado na manipulação dos produtos de parto é usado noutras áreas da exploração	Não	6	3	50,0	3	50,0	0,115	1,000	1,053	0,893
	Sim ^a	19	8	42,1	11	57,9				
Desparasita externamente os animais	Não ^a	5	2	40,0	3	60,0	0,041	1,000	1,032	0,936
	Sim	20	9	45,0	11	55,0				
Frequência da desparasitação (n=20)	1x/ano ^a	13	5	38,5	8	61,5	0,642	0,642	1,131	0,749
	2x/ano	7	4	57,1	3	42,9				
Programa de desinfecção regular das instalações	QN ^a	7	1	14,3	6	85,7	3,484	0,090	1,286	0,459
	Sim	18	10	55,6	8	44,4				
Aquisição de animais de outras explorações nos últimos 5 anos	Não ^a	17	7	41,2	10	58,8	0,172	1,000	1,059	0,869
	Sim	8	4	50,0	4	50,0				

Os pressupostos dos testes paramétricos utilizados no PCR encontram-se em anexo na Tabela 21.

8.3.3.2 Indicadores x ELISA

Relativamente às condições gerais das explorações e saúde dos efetivos, e de acordo com os resultados apresentados na Tabela 18, genericamente, as explorações positivas para o ELISA apresentaram valores mais elevados a nível do número total de animais ($M \pm DP=185,9 \pm 110,68$), densidade animal ($M \pm DP=110,1 \pm 47,20$), número de vacas em lactação ($M \pm DP=93,8 \pm 60,47$), taxa anual de mastites ($M \pm DP=31,2 \pm 25,88$ %) e taxa anual de abortos (M

$\pm DP=4,9 \pm 5,05$). Por sua vez, as explorações ELISA negativas apresentaram valores superiores relativamente à taxa anual de RMF e metrites/endometrites ($M \pm DP=23,5 \pm 16,61$ %).

Apesar das diferenças verificadas entre explorações positivas e negativas ao teste de ELISA, estas não se demonstraram estatisticamente significativas. Como tal, não se pode afirmar que a presença de Ac anti-*C. burnetii* tenha dependido destes fatores no presente estudo ($p>0,05$). A análise da RP para cada um dos indicadores reforça que não se verificou um impacto significativo destes na prevalência de DNA de *C. burnetii* na amostra, com nenhuma a emergir como estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Tabela 18 - Resultados do ELISA em função das condições gerais das explorações e saúde dos efetivos. a: Estatística e valor-p do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Indicador	ELISA	n	Média \pm DP	t	p	RP	Wald X^2 p
Nº total de animais	-	8	179,8 \pm 132,02	64,500 ^a	0,838	1,000	0,903
	+	17	185,9 \pm 110,68				
Densidade animal	-	8	106,1 \pm 47,36	-	0,842	1,000	0,833
	+	17	110,1 \pm 47,20				
Nº de vacas em lactação	-	8	87,1 \pm 57,38	67,000 ^a	0,954	1,000	0,770
	+	17	93,8 \pm 60,47				
Média IA/CN por animal	-	8	2,0 \pm 0,37	64,500 ^a	0,831	0,977	0,835
	+	17	2,0 \pm 0,52				
Taxa anual de mastites (%)	-	7	20,8 \pm 9,95	44,500 ^a	0,341	1,002	0,062
	+	17	31,2 \pm 25,88				
Taxa anual de RMF e metrites/endometrites (%)	-	7	23,5 \pm 16,61	40,500 ^a	0,227	0,966	0,366
	+	17	16,9 \pm 14,47				
Taxa anual de abortos (%)	-	8	4,0 \pm 3,02	65,500 ^a	0,884	1,006	0,487
	+	17	4,9 \pm 5,05				

Na Tabela 19, encontram-se apresentados os resultados dos testes ELISA em função das condições de biossegurança das explorações.

Da sua leitura descritiva, observou-se que a prevalência de Ac específicos para *C. burnetii* nas amostras de BTM de explorações que não apresentam o seu perímetro vedado em toda a sua extensão (77,8%) foi superior ao constatado nas explorações em que essa condição se verifica (42,9%). Explorações onde existe contacto de cães e gatos com os animais da exploração, assim como com os locais de armazenamento de alimento e material para as camas, também demonstraram uma maior positividade no ELISA (75,0%), face às explorações onde esse contacto não foi reportado (61,5%).

Nas explorações que realizam uma desinfeção regular da maternidade, a prevalência de Ac anti-*C. burnetii* (78,6%) mostrou-se superior ao observado nas explorações que não praticam

este procedimento regularmente (40,0%). Adicionalmente, as seis explorações que indicaram não utilizar o mesmo equipamento de proteção individual, usado na manipulação dos produtos de parto, noutras áreas da exploração, demonstraram-se todas positivas ao ELISA (100,0%), comparativamente às explorações que o fazem (57,9%)

Relativamente aos chorumes, a prevalência de testes ELISA positivos foi de 100% nas explorações que não os aplicam nos campos e de 66,7% naquelas que não realizam qualquer tratamento a estes resíduos antes da sua aplicação nos campos. Para a única exploração que indicou realizar algum tipo de tratamento aos chorumes, o resultado do ELISA foi negativo.

A prevalência de Ac anti-*C. burnetii* também se demonstrou superior nas explorações que desparasitam externamente os seus animais (75,0%), comparativamente às que não realizam este procedimento (40,0%).

Apesar das diferenças observadas a nível da prevalência de Ac específicos para *Coxiella burnetii*, estas não se revelaram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Como tal, pode afirmar-se que não existem evidências da relação entre a positividade do ELISA e os indicadores avaliados no presente estudo.

Novamente, procedeu-se à testagem de significância das razões de prevalência de ELISA positivo por cada indicador da exploração avaliado, através da realização de regressões de Poisson simples, por estimação robusta. Como tal, observou-se que a prevalência de Ac foi:

- 24,4% superior nas explorações com perímetro vedado em toda a sua extensão, comparativamente às explorações onde tal não se verifica (RP=1,244; $p=0,124$);
- 27,6% superior nas explorações que realizam uma desinfeção regular da maternidade, comparativamente às explorações que não o fazem (RP=1,276; $p=0,827$);
- 26,7% significativamente superior nas explorações que não utilizam o equipamento usado na manipulação dos produtos de parto noutras áreas da exploração, comparativamente às explorações que o fazem (RP=1,267; $p < 0,001$);
- 15,3% superior nas explorações onde se procede à desinfeção das instalações apenas quando necessário, face às explorações onde esta prática é realizada de forma regular (RP=1,153; $p=0,159$);
- 20,0% significativamente superior nas explorações que não aplicam os próprios chorumes nos campos, comparativamente às explorações que os aplicam sem tratamento prévio (RP=1,200; $p=0,003$);
- 40,0% significativamente inferior nas explorações que fazem algum tipo de tratamento dos chorumes, antes da sua aplicação nos campos, face às que não realizam este procedimento (RP=0,600; $p < 0,001$);

Tabela 19 - Resultados do ELISA em função das condições de biossegurança das explorações.
 a: Categoria de referência; NA: Não aplica; QN: Quando necessário.

Indicador		Resultado do ELISA					X ²	p	RP	Wald X ² p
		Total	-		+					
		N	n	%	n	%				
Exploração com perímetro vedado em toda a extensão	Não ^a	7	4	57,1	3	42,9	2,824	0,156	1,244	0,124
	Sim	18	4	22,2	14	77,8				
Contacto de cães e gatos com os animais da exploração	Não ^a	13	5	38,5	8	61,5	0,520	0,673	1,083	0,466
	Sim	12	3	25,0	9	75,0				
Contacto de cães e gatos com locais de armazenamento de alimento e material para as camas	Não ^a	13	5	38,5	8	61,5	0,520	0,673	1,083	0,466
	Sim	12	3	25,0	9	75,0				
Existência de maternidade	Não ^a	6	2	33,3	4	66,7	0,006	1,000	1,011	0,937
	Sim	19	6	31,6	13	68,4				
Desinfecção regular da maternidade (n=19)	Não ^a	5	3	60,0	2	40,0	2,537	0,262	1,276	0,148
	Sim	14	3	21,4	11	78,6				
Utiliza o estrume da maternidade nos campos (n=19)	Não	7	2	28,6	5	71,4	0,046	1,000	1,029	0,827
	Sim ^a	12	4	33,3	8	66,7				
Chorume é tratado antes da aplicação nos campos	Não ^a	21	7	33,3	14	66,7	2,911	0,188	0,600	<0,001
	Sim	1	1	100,0	0	0,0				
	NA	3	0	0,0	3	100,0				
O equipamento de proteção utilizado na manipulação dos produtos de parto é usado noutras áreas da exploração	Não	6	0	0,0	6	100,0	3,715	0,129	1,267	<0,001
	Sim ^a	19	8	42,1	11	57,9				
Desparasita externamente os animais	Não ^a	5	3	60,0	2	40,0	2,252	0,283	1,250	0,179
	Sim	20	5	25,0	15	75,0				
Frequência da desparasitação (n=20)	1x/ano	13	3	23,1	10	76,9	0,073	1,000	1,032	0,792
	2x/ano ^a	7	2	28,6	5	71,4				
Programa de desinfecção regular das instalações	QN ^a	7	1	14,3	6	85,7	1,402	0,362	1,153	0,159
	Sim	18	7	38,9	11	61,1				
Aquisição de animais de outras explorações nos últimos 5 anos	Não ^a	17	5	29,4	12	70,6	0,164	1,000	1,050	0,694
	Sim	8	3	37,5	5	62,5				

Os pressupostos dos testes paramétricos utilizados no ELISA encontram-se em anexo na Tabela 22.

8.4 Discussão

Da análise das amostras de BTM, obteve-se uma prevalência molecular de *Coxiella burnetii* de 56,0%, assim como uma seroprevalência de 68,0%.

Estes valores estão próximos do observado em alguns estudos europeus com bovinos leiteiros, nomeadamente em Espanha, (51,7% PCR positivo em BTM, 2009/10), Itália (60,3% PCR positivo em BTM, 2011) e Países Baixos (56,6% PCR positivo e 78,6% ELISA positivo em BTM, 2007).^{161,162,165}

A nível nacional, o valor de seroprevalência apresentado na presente dissertação (68,0%) foi ligeiramente superior ao observado em dois estudos desenvolvidos no Norte de Portugal, nomeadamente no concelho de Barcelos, muito próximo de Vila do Conde, que evidenciaram prevalências de Ac específicos para *C. burnetii* de 61,1% (Pimenta et al., 2015) e 62,0% (Maia, 2016) em amostras de BTM de bovinos leiteiros.^{172,177} Em dois estudos, na Ilha Terceira (Rodrigues, 2019) e na Região Centro (Leitão, 2023), a seroprevalência de *C. burnetii* mostrou-se superior ao verificado em Rio Mau, verificando-se uma seroprevalência de 75,8% e 90,5% em amostras de BTM de bovinos leiteiros, respetivamente.^{175,178} Ainda na Região Centro, foram conduzidos dois estudos com recurso a PCR e ELISA, os quais demonstraram uma prevalência molecular de *C. burnetii* inferior ao observado na presente dissertação, com 20,0% (Anastácio et al., 2016) e 31,0% (Coelho et al., 2022) de explorações positivas ao teste de PCR.^{170,179} No entanto, um dos estudos demonstrou uma seroprevalência bastante superior, com 96,7% das explorações positivas para o ELISA, realçando a distribuição da bactéria na área em estudo.¹⁷⁹

Relativamente à região de Rio Mau, foram observados quatro cenários distintos, no que diz respeito ao cruzamento dos resultados obtidos nos testes de PCR e ELISA, com explorações negativas aos dois testes, positivas apenas ao ELISA, positivas apenas ao PCR e positivas a ambos.

Quatro das explorações (16,0%) apresentaram-se negativas tanto para o PCR como para o ELISA, não existindo não só evidências de infeção ativa, uma vez que o PCR não identificou a presença de DNA de *C. burnetii* na amostra de BTM, como de um contacto prévio dos animais da exploração com a bactéria, dado que o ELISA não detetou a presença de Ac específicos para a mesma nas amostras de BTM. Tendo em conta que um resultado positivo na análise de BTM pelo teste de ELISA ocorre quando pelo menos 20% das fêmeas lactantes são seropositivas, espera-se que a grande maioria dos animais das explorações ELISA negativas não se encontrem infetados.²⁷⁹ Adicionalmente, tendo em conta o baixo grau de seropositividade a nível animal, e dada a sua proximidade a explorações com infeções ativas, seria vantajoso para estas explorações reforçar as suas medidas de biossegurança, nomeadamente de bioexclusão, e considerar a vacinação dos efetivos, uma vez que representam o grupo mais indicado para se instituírem protocolos de vacinação.

Por sua vez, sete explorações (28,0%) demonstraram-se positivas apenas no teste de ELISA, não demonstrando evidências de uma infeção ativa, mas indicando a presença de Ac

anti-*C. burnetii* nas amostras de BTM. Neste caso, tendo em conta que nenhuma exploração participante no estudo declarou vacinar os seus animais, existem evidências de contacto prévio dos animais com a bactéria. No entanto, a presença de Ac não pode ser associada exclusivamente a uma infeção atual, dado que os animais podem permanecer seropositivos vários anos após a resolução de uma infeção aguda.¹⁷¹ Adicionalmente, estudos demonstraram que a seropositividade a nível animal é maior quando o título de Ac na amostra de BTM também é superior, sugerindo que, de um ELISA em BTM negativo, ou mesmo de um positivo fraco, pode esperar-se um número elevado de animais seronegativos.^{165,279,280} Dado que seis das sete explorações nesta situação corresponderam a positivos fracos no teste de ELISA, a vacinação dos animais poderá ser uma boa medida de controlo da coxielose a instituir nestas explorações.

Quatro explorações (16,0%) demonstraram positividade apenas para o teste de PCR, indicando uma situação de infeção ativa, mas sem presença de Ac no BTM. Uma amostra de BTM positiva para o PCR e negativa para o ELISA pode ser explicada por uma insuficiente sensibilidade do ELISA utilizado ou por se estar na presença de uma infeção aguda recente, onde ainda não foi iniciada a produção de Ac específicos para *Coxiella burnetii*.¹⁶⁵ Nestas situações, teria sido interessante realizar uma nova análise destas explorações, de forma a compreender se os animais eventualmente seroconverteram.

Por fim, dez explorações (40,0%) apresentaram positividade tanto no PCR como no ELISA, evidenciando uma infeção bem estabelecida na exploração, onde estão presentes animais a excretar ativamente *Coxiella burnetii*, com imunidade específica para a bactéria já desenvolvida. Nas explorações PCR positivas há uma importância acrescida relativamente à instituição de medidas de biossegurança, referidas previamente nesta dissertação, de forma a controlar a evolução da doença na própria exploração, a proteger os efetivos vizinhos, nomeadamente os não infetados, e minimizar a ocorrência de casos humanos de febre Q nos indivíduos em contacto direto com estes animais. Nestas explorações, pode ainda efetuar-se uma testagem de amostras de dez em dez animais, de forma a averiguar o número de excretadores, e, caso este seja baixo, eventualmente eliminá-los e proceder à vacinação do restante efetivo.⁷⁹

Apesar destes resultados, deve ter-se em conta as limitações inerentes à análise de amostras de BTM através dos métodos de PCR e ELISA.

Nos bovinos, existe uma elevada heterogeneidade relativamente aos padrões de excreção de *Coxiella burnetii*, podendo a excreção ocorrer de forma persistente, intermitente ou esporádica, com durações variáveis. Adicionalmente, esta excreção ocorre não só no leite, como também nos produtos do parto, muco vaginal, fezes, urina e sémen, podendo existir animais a excretar a bactéria por várias vias simultaneamente.^{75,88} No entanto, num estudo com 242 vacas leiteiras naturalmente infetadas, verificou-se que 65,4% dos animais foram detetados como excretadores por apenas uma via, com 33,6%, 20,9% e 10,9% a excretar apenas no leite, fezes e muco vaginal, respetivamente.²⁸¹ Como tal, o facto de uma exploração apresentar um resultado PCR negativo na análise de BTM, não implica necessariamente que os animais não se encontrem infetados por *Coxiella burnetii*, podendo existir uma grande proporção de animais infetados que simplesmente não excreta no leite ou que apresenta padrões de excreção

esporádicos ou intermitentes, não sendo detetados como excretores no momento da colheita da amostra.

Relativamente à produção de Ac específicos para *C. burnetii*, cerca de 65% dos animais com amostras positivas para o PCR permanece ELISA negativo, sendo que a seroconversão parece ocorrer mais frequentemente nos primeiros 90 dias de lactação, comparativamente ao período de secagem, e em vacas primíparas comparativamente às múltiparas.^{255,282} Isto pode então explicar alguns dos resultados observados, nomeadamente nas explorações PCR positivas e ELISA negativas, sendo que a seronegatividade pode não se dever necessariamente a uma insuficiente sensibilidade do teste de ELISA ou a uma infeção ativa recente, uma vez que não foi considerada a idade, número de gestações e fase da lactação dos animais no presente estudo.

Ainda que a análise do BTM seja um meio acessível para detetar doenças infecciosas a nível das explorações e estimar a sua prevalência numa determinada região, uma grande limitação deste tipo de amostra assenta no facto de apenas contabilizar o leite de animais que se encontram a contribuir para o tanque no momento da recolha. No presente estudo, dos 4599 animais que integram as 25 explorações participantes, apenas 2292 (49,8%) corresponderam a vacas em lactação. Os restantes 50,2% incluem as vacas no período seco, animais com mastites clínicas, ou outras condições que impeçam a sua ordenha, e animais muito jovens que, apesar de não contribuírem para o leite do tanque, podem continuar a excretar *C. burnetii* para o ambiente, e conseqüentemente possibilitar a ocorrência de falsos negativos nos testes laboratoriais.²⁸³ Como tal, para mitigar as possíveis variações observadas nos resultados dos testes laboratoriais ao longo do tempo, e assim garantir uma maior eficiência a nível do diagnóstico, é aconselhada uma análise repetida das amostras de BTM por PCR e ELISA, a intervalos regulares, principalmente nas situações em que é crítico averiguar o estatuto da exploração relativamente à coxielose.^{88,165,255}

Na análise das informações obtidas nos inquéritos aos produtores, nenhum dos fatores avaliados revelou uma associação estatisticamente significativa com a positividade para os testes de PCR ou ELISA, podendo, no entanto, comentar-se estes dados de um ponto de vista descritivo.

Vários fatores apresentaram uma concordância entre ambos os testes laboratoriais, estando de acordo com a literatura. O grupo de explorações positivas para o PCR, assim como o grupo positivo para ELISA, demonstraram uma média superior de número total de animais, densidade animal, vacas em lactação e incidência de mastites, face às explorações negativas. O mesmo foi verificado nas explorações que reportaram uma falta de regularidade na desinfeção das instalações e um contacto de cães e gatos com os animais da exploração, assim como os locais de armazenamento do alimento e material para as camas. Contrariamente ao esperado, na análise dos resultados individuais de PCR e ELISA, o grupo que reportou a existência de uma maternidade demonstrou uma maior percentagem de explorações positivas, comparativamente às explorações sem maternidade instituída, assim como as explorações que indicaram realizar uma desinfeção regular deste local, face às que não realizam este procedimento frequentemente.

A explicação para estes resultados poderá assentar no método de limpeza e desinfecção da maternidade, assim como a sua localização na exploração. Dado que os produtores não forneceram mais detalhes a este respeito, a falha na remoção da totalidade das camas sujas e fezes, previamente à colocação da palha nova e cal viva, ou mesmo a utilização de métodos de que induzam a formação de aerossóis, como lavagens a pressões elevadas, podem constituir uma possível explicação para estes resultados. Adicionalmente, algumas das maternidades poderão estar colocadas de forma a permitir um grande fluxo de ar em direção a outras áreas da exploração, o que permite disseminar a bactéria a outros animais que se encontrem a favor do vento. O grupo que não adquiriu novos animais nos últimos cinco anos também demonstrou uma percentagem de explorações ligeiramente superior, tanto a nível do teste de PCR como do ELISA, face às explorações que não o fizeram. Ainda que seja considerado um fator de risco, existe sempre a possibilidade de se adquirirem animais de explorações seronegativas, o que pode ter sido o caso nas explorações em estudo.

Os restantes fatores avaliados não demonstraram concordância entre os dois testes laboratoriais. Em relação ao PCR, o grupo com o perímetro vedado em toda a sua extensão apresentou uma maior percentagem de explorações positivas, face ao grupo onde esta situação não se verifica. No entanto, foi verificado o contrário em relação ao teste de ELISA. O mesmo foi observado relativamente à taxa anual de retenção de membranas fetais, metrites e endometrites, e à prática de desparasitação dos animais, sendo que as explorações com uma maior taxa e que não desparasitam os seus animais demonstraram uma maior percentagem de PCR positivo, contrariamente ao verificado em relação ao ELISA. A utilização de equipamentos diferentes na maternidade e nas outras áreas da exploração também demonstrou uma percentagem menor de explorações positivas ao PCR, contrariamente ao verificado no ELISA, em que todas as explorações que declararam ter esse cuidado revelaram seropositividade.

A não concordância nos testes laboratoriais em alguns dos fatores avaliados poderá estar, em parte, relacionada com a elevada percentagem de animais excretadores que não seroconvertem, assim como a possível persistência de *Ac* durante vários anos após o término da infeção, tal como já referido anteriormente. Adicionalmente, apesar de ter sido realizado de uma forma padronizada e sempre pelo mesmo entrevistador, o inquérito apresenta uma grande limitação, uma vez que cada produtor formula a sua própria interpretação face às questões colocadas e nem todos apresentam o mesmo grau de conhecimento relativamente aos vários fatores avaliados. Além disso, foram apenas avaliadas 25 explorações, com alguns dos fatores a apresentar uma reduzida representatividade neste estudo, sendo que, futuramente, seria benéfico avaliar-se uma amostra superior de explorações, possivelmente revelando associações estatisticamente significativas, não encontradas no presente estudo.

Por fim, todos os produtores foram questionados relativamente ao seu grau de conhecimento da febre Q, com a maioria (68,0%) a desconhecer a doença. No entanto, os 32,0% que afirmaram conhecer a designação de febre Q, admitiram não conhecer a sintomatologia associada. Adicionalmente, apenas um produtor declarou conhecer o termo “zoonose” e, consequentemente, que a febre Q integra a lista de zoonoses conhecidas. Uma das

responsabilidades do médico veterinário é precisamente manter os produtores informados e atualizados relativamente a várias doenças, nomeadamente as zoonoses, de forma a poderem proteger-se a si mesmos e aos seus efetivos. Nesse sentido, no dia 18 de outubro de 2023, com apoio da CEVA Portugal e da CAVC, foi realizada uma palestra aberta a todos os produtores, agrónomos, médicos e médicos veterinários, assim como quaisquer outros indivíduos interessados. Primeiramente, foi realizada uma breve introdução da febre Q, com ênfase na sintomatologia, métodos de diagnóstico e medidas de controlo, assim como os resultados dos testes laboratoriais e da análise da informação obtida nos inquéritos aos produtores de Rio Mau. Foi reforçado o carácter zoonótico da doença, enfatizando a necessidade da utilização de equipamentos de proteção individual, principalmente na manipulação de materiais resultantes de partos e abortos em explorações positivas, contando também com a participação de um indivíduo que contraiu febre Q vários anos antes da realização do presente estudo. Este descreveu todo o processo, desde as razões que o levaram a ser exposto a *Coxiella burnetii*, uma vez que contactava frequentemente com pequenos ruminantes, até ao diagnóstico de febre Q e complicações a longo prazo que persistem até aos dias de hoje, terminando com o esclarecimento de todas as dúvidas que surgiram no seguimento da palestra.

8.5 Conclusão

Em suma, foi possível concluir que a *Coxiella burnetii* se encontra bastante disseminada na região de Rio Mau, com mais de metade das explorações a demonstrarem evidências de infecção ativa e/ou exposição prévia à bactéria.

Da análise dos dados obtidos nos inquéritos, ainda que não tenham sido encontradas associações estatisticamente significativas com a positividade dos testes de PCR e ELISA, foi possível constatar que algumas das explorações têm já instituídas boas medidas de manejo e biossegurança, havendo, no entanto, margem para melhorar.

Apesar da resistência esperada por parte dos produtores, o uso de máscara na manipulação de produtos de parto ou aborto deve ser encorajado, principalmente nas explorações onde seja comprovada a excreção ativa de *C. burnetii*, em conjunto com o restante material de proteção individual descartável. A instituição de um local específico para os partos também é aconselhada, uma vez que o isolamento dos animais parturientes, geralmente com maiores níveis de excreção, é muito importante para minimizar a contaminação ambiental, quebrar a circulação da bactéria na exploração e, assim, controlar a sua disseminação aos restantes animais. No entanto, o local escolhido para o efeito, assim como os métodos utilizados na sua limpeza e desinfecção, devem ser efetuados com base no descrito anteriormente, de modo que estas medidas possam ser consideradas eficazes. Adicionalmente, o material de proteção utilizado na maternidade não deve ser utilizado noutras áreas da exploração, de forma a impedir o transporte mecânico de *C. burnetii* pelas instalações, e todos os produtos resultantes de partos e abortos devem ser incinerados ou enterrados com aplicação de cal.

No futuro, seria interessante aumentar a área de estudo e o número de explorações participantes, uma vez que determinados fatores demonstraram uma baixa representatividade, impossibilitando a formulação de conclusões mais seguras. Adicionalmente, sugere-se um método de testagens repetidas, a intervalos regulares, de forma a averiguar possíveis alterações da excreção da bactéria e/ou seropositividade nas explorações envolvidas.

Por fim, o testemunho do convidado da palestra realizada na CAVC evidenciou um aspeto muito importante, tendo em conta que o diagnóstico de febre Q só foi formulado depois do médico veterinário assistente da exploração onde o indivíduo trabalhava ter reconhecido os seus sintomas. O médico veterinário, sabendo que a exploração de pequenos ruminantes era positiva para coxielose, e após ter conhecimento da sua situação, aconselhou-o a pedir a testagem para *Coxiella burnetii*, resultando na instituição do tratamento adequado e conseqüente melhoria da sintomatologia. Este exemplo vem reforçar a importância de se estabelecerem vias de comunicação entre todas as áreas da saúde, no âmbito do conceito *One Health*, de forma a possibilitar uma deteção e prevenção de doenças mais eficiente.

9 Anexos

Tabela 20 - Inquérito realizado aos produtores de Rio Mau, Vila do Conde.

Condições gerais da exploração e saúde do efetivo	
- Marca da exploração:	_____
- Área coberta dedicada aos animais (m ²):	_____
- Nº total de animais:	_____
- Nº de vacas em lactação:	_____
- Nº médio de IA's/CN's por animal para que este fique gestante:	_____
- Incidência de mastites (%):	_____
- Incidência de RMF e Metrites/Endometrites: (%):	_____
- Incidência de abortos (%):	_____
Condições de biossegurança da exploração	
- A exploração é vedada em toda a sua extensão?	Sim___ Não___
- Há contacto de cães e/ou gatos com os animais da exploração?	Sim___ Não___
- Há contacto de cães e/ou gatos com o local de armazenamento do alimento e do material para as camas?	Sim___ Não___
- A exploração possui um local específico para a ocorrência dos partos?	Sim___ Não___
- Se sim, desinfeta-o regularmente?	Sim___ Não___
- Se sim, utiliza os estrumes resultantes nos campos?	Sim___ Não___
- Utiliza os chorumes nos campos?	Sim___ Não___
- Se sim, aplica algum tratamento prévio?	Sim___ Não___
- Qual o destino dos produtos de parto?	_____
- Que equipamentos de proteção individual utiliza quando os manipula?	_____

- Utiliza os mesmos equipamentos noutras áreas da exploração?	Sim___ Não___
- Desparasita externamente os seus animais?	Sim___ Não___
- Fornece vestuário e calçado próprio a visitantes?	Sim___ Não___
- Tem instituído algum programa regular de limpeza e desinfeção das instalações?	Sim___ Não___
- Adquiriu animais de outras explorações nos últimos 5 anos?	Sim___ Não___
Grau de conhecimento em relação à Febre Q	
- Já ouviu falar da Febre Q?	Sim___ Não___
- Sabe o que é uma zoonose?	Sim___ Não___
- Sabe que a Febre Q se classifica como uma zoonose?	Sim___ Não___
- Tem historial de casos de Febre Q na sua exploração?	Sim___ Não___
- Se sim, em que períodos? _____	
- Vacina os seus animais contra a Febre Q?	Sim___ Não___

Tabela 21 - Pressupostos dos testes paramétricos (PCR).

	Resultado PCR	Tests of Normality Shapiro-Wilk			Levene's Test for Equality of Variances		Decisão de Teste a realizar
		Statistic	df	Sig.	F	p	
Nº Total de animais	Negativo	,845	11	,036			Não Paramétrico Mann-Whitney
	Positivo	,951	14	,571			
Densidade animal	Negativo	,942	11	,547	0,931	0,345	Paramétrico T
	Positivo	,931	14	,315			
Nº de vacas em lactação	Negativo	,872	11	,083	0,000	0,983	Paramétrico T
	Positivo	,928	14	,290			
Média IA+CN / Animal	Negativo	,911	11	,248	1,022	0,323	Paramétrico T
	Positivo	,911	14	,164			
Taxa Anual de mastites (%)	Negativo	,871	11	,080			Não Paramétrico Mann-Whitney
	Positivo	,848	13	,027			
Taxa Anual de RMF e Metrites/Endometrites (%)	Negativo	,822	11	,018			Não Paramétrico Mann-Whitney
	Positivo	,804	13	,008			
Taxa Anual de abortos (%)	Negativo	,687	11	<,001			Não Paramétrico Mann-Whitney
	Positivo	,901	14	,115			

Tabela 22 - Pressupostos dos testes paramétricos (ELISA).

	Resultado ELISA	Tests of Normality Shapiro-Wilk			Levene's Test for Equality of Variances		Decisão de Teste a realizar
		Statistic	df	Sig.	F	p	
Nº Total de animais	Negativo	,942	8	,632			Não Paramétrico
	Positivo	,881	17	,033			Mann-Whitney
Densidade animal	Negativo	,982	8	,971	0,077	0,783	Paramétrico
	Positivo	,977	17	,927			T
Nº de vacas em lactação	Negativo	,964	8	,843			Não Paramétrico
	Positivo	,853	17	,012			Mann-Whitney
Média IA+CN / Animal	Negativo	,909	8	,348			Não Paramétrico
	Positivo	,877	17	,029			Mann-Whitney
Taxa Anual de mastites (%)	Negativo	,872	7	,195			Não Paramétrico
	Positivo	,818	17	,004			Mann-Whitney
Taxa Anual de RMF e Metrites/Endometrites (%)	Negativo	,916	7	,438			Não Paramétrico
	Positivo	,761	17	<,001			Mann-Whitney
Taxa Anual de abortos (%)	Negativo	,866	8	,136			Não Paramétrico
	Positivo	,696	17	<,001			Mann-Whitney

10 Referências bibliográficas

1. Maurin, M. & Raoult, D. Q Fever. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 518–553 (1999).
2. Hirschmann, J. V. The Discovery of Q Fever and Its Cause. *Am. J. Med. Sci.* **358**, 3–10 (2019).
3. Derrick, E. A Mystery Fever Invades Brisbane. *Hist. Rec. Aust. Sci.* **2**, 39 (1971).
4. Derrick, E. H. The epidemiology of Q fever. *Epidemiol. Infect.* **43**, 357–361 (1944).
5. Burnet, F. M., Freeman, M., Derrick, E. H. & Smith, D. J. W. THE SEARCH FOR IMMUNOLOGICAL RELATIONSHIP BETWEEN “Q” FEVER AND OTHER RICKETTSIOSES. *Med. J. Aust.* **2**, 51–54 (1939).
6. Davis, G. E., Cox, H. R., Parker, R. R. & Dyer, R. E. A Filter-Passing Infectious Agent Isolated from Ticks. *Public Health Rep. 1896-1970* **53**, 2259 (1938).
7. Dyer, R. E. Similarity of Australian ‘Q’ Fever and a Disease Caused by an Infectious Agent Isolated from Ticks in Montana. *Public Health Rep. 1896-1970* **54**, 1229 (1939).
8. Burnet, F. M. & Freeman, M. A COMPARATIVE STUDY OF RICKETTSIAL STRAINS FROM AN INFECTION OF TICKS IN MONTANA (UNITED STATES OF AMERICA) AND FROM “Q” FEVER. *Med. J. Aust.* **2**, 887–891 (1939).
9. Derrick, E. H. RICKETTSIA BURNETI: THE CAUSE OF “Q” FEVER. *Med. J. Aust.* **1**, 14–14 (1939).
10. Philip, C. B. Comments on the Name of the Q Fever Organism. *Public Health Rep. 1896-1970* **63**, 58 (1948).
11. Lencastre Monteiro, R., Nascimento, R., Diogo, J., Bernardino, R. & Nazário Leão, R. Q Fever: An Emerging Reality in Portugal. *Cureus* (2021) doi:10.7759/cureus.19018.
12. Nunes-Silva, C. *et al.* Recomendações para o Tratamento e Seguimento de Doentes com Febre Q. *Acta Médica Port.* **35**, 494–503 (2022).
13. Pikoulas, A., Arapi, S., Kosta, G., Lampropoulos, C. & Papaioannou, I. Q Fever Severe Pericarditis With Cardiac Tamponade: A Case Report. *Cureus* (2023) doi:10.7759/cureus.34980.
14. Porter, S. R., Czaplicki, G., Mainil, J., Guattéo, R. & Saegerman, C. Q Fever: Current State of Knowledge and Perspectives of Research of a Neglected Zoonosis. *Int. J. Microbiol.* **2011**, 1–22 (2011).
15. Van Der Hoek, W. *et al.* Epidemic Q Fever in Humans in the Netherlands. in *Coxiella burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium* (eds. Toman, R., Heinzen, R. A., Samuel, J. E. & Mege, J.-L.) vol. 984 329–364 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2012).
16. Schneeberger, P. M., Wintenberger, C., Van Der Hoek, W. & Stahl, J. P. Q fever in the Netherlands – 2007–2010: What we learned from the largest outbreak ever. *Médecine Mal. Infect.* **44**, 339–353 (2014).
17. Morroy, G. *et al.* Of goats and humans; the societal costs of the Dutch Q fever saga. *Int. J. Infect. Dis.* **16**, e266 (2012).

18. Van Asseldonk, M. A. P. M., Prins, J. & Bergevoet, R. H. M. Economic assessment of Q fever in the Netherlands. *Prev. Vet. Med.* **112**, 27–34 (2013).
19. Honarmand, H. Q Fever: An Old but Still a Poorly Understood Disease. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2012**, 1–8 (2012).
20. Raoult, D., Marrie, T. & Mege, J. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 219–226 (2005).
21. España, P. P., Uranga, A., Cillóniz, C. & Torres, A. Q Fever (Coxiella Burnetii). *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **41**, 509–521 (2020).
22. Arricau-Bouvery, N. & Rodolakis, A. Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet. Res.* **36**, 327–349 (2005).
23. Oyston, P. C. F. & Davies, C. Q fever: the neglected biothreat agent. *J. Med. Microbiol.* **60**, 9–21 (2011).
24. McCaul, T. F. & Williams, J. C. Developmental cycle of Coxiella burnetii: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J. Bacteriol.* **147**, 1063–1076 (1981).
25. Sandoz, K. M., Sturdevant, D. E., Hansen, B. & Heinzen, R. A. Developmental transitions of Coxiella burnetii grown in axenic media. *J. Microbiol. Methods* **96**, 104–110 (2014).
26. Minnick, M. F. & Raghavan, R. Developmental Biology of Coxiella burnetii. in *Coxiella burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium* (eds. Toman, R., Heinzen, R. A., Samuel, J. E. & Mege, J.-L.) vol. 984 231–248 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2012).
27. Beare, P. A., Jeffrey, B. M., Long, C. M., Martens, C. M. & Heinzen, R. A. Genetic mechanisms of Coxiella burnetii lipopolysaccharide phase variation. *PLOS Pathog.* **14**, e1006922 (2018).
28. Narasaki, C. T. & Toman, R. Lipopolysaccharide of Coxiella burnetii. in *Coxiella burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium* (eds. Toman, R., Heinzen, R. A., Samuel, J. E. & Mege, J.-L.) vol. 984 65–90 (Springer Netherlands, Dordrecht, 2012).
29. Toman, R., Škultéty, L., Ftáček, P. & Hricovíni, M. NMR study of virenose and dihydrohydroxystreptose isolated from Coxiella burnetii phase I lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* **306**, 291–296 (1998).
30. Toman, R., Skultety, L. & Ihnatko, R. Coxiella burnetii Glycomics and Proteomics-Tools for Linking Structure to Function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1166**, 67–78 (2009).
31. Beare, P. A. *et al.* Genetic Diversity of the Q Fever Agent, *Coxiella burnetii*, Assessed by Microarray-Based Whole-Genome Comparisons. *J. Bacteriol.* **188**, 2309–2324 (2006).
32. Brom, R. V. D., Engelen, E. van, Roest, H. I. J., Hoek, W. van D. & Vellema, P. Coxiella burnetii infections in sheep or goats: an opinionated review. *Vet. Microbiol.* **181**, 119–129 (2015).
33. Voht, D. E. & Heinzen, R. A. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of Coxiella burnetii. *Cell. Microbiol.* **9**, 829–840 (2007).

34. Pechstein, J., Schulze-Luehrmann, J. & Lührmann, A. Coxiella burnetii as a useful tool to investigate bacteria-friendly host cell compartments. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**, 77–83 (2018).
35. Van Schaik, E. J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M. M. & Samuel, J. E. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium Coxiella burnetii. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 561–573 (2013).
36. Capo, C. *et al.* Coxiella burnetii Avoids Macrophage Phagocytosis by Interfering with Spatial Distribution of Complement Receptor 3. *J. Immunol.* **170**, 4217–4225 (2003).
37. Capo, C. *et al.* Subversion of Monocyte Functions by Coxiella burnetii : Impairment of the Cross-Talk Between $\alpha\beta 3$ Integrin and CR3. *J. Immunol.* **163**, 6078–6085 (1999).
38. Heppell, C. W., Egan, J. R. & Hall, I. A human time dose response model for Q fever. *Epidemics* **21**, 30–38 (2017).
39. Minnick, M. F. & Raghavan, R. Genetics of Coxiella burnetii : on the path of specialization. *Future Microbiol.* **6**, 1297–1314 (2011).
40. Latomanski, E. A. & Newton, H. J. Interaction between autophagic vesicles and the Coxiella -containing vacuole requires CLTC (clathrin heavy chain). *Autophagy* **14**, 1710–1725 (2018).
41. Coleman, S. A., Fischer, E. R., Howe, D., Mead, D. J. & Heinzen, R. A. Temporal analysis of Coxiella burnetii morphological differentiation. *J. Bacteriol.* **186**, 7344–7352 (2004).
42. Angelakis, E. & Raoult, D. Q fever. *Vet. Microbiol.* **140**, 297–309 (2010).
43. Celina, S. S. & Cerný, J. Coxiella burnetii in ticks, livestock, pets and wildlife: A mini-review. *Front. Vet. Sci.* **9**, 1068129 (2022).
44. Eldin, C. *et al.* From Q Fever to Coxiella burnetii Infection: a Paradigm Change. *Clin. Microbiol. Rev.* **30**, 115–190 (2017).
45. Khademi, P. *et al.* Molecular detection of Coxiella burnetii in horse sera in Iran. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **72**, 101521 (2020).
46. González-Barrio, D., Maio, E., Vieira-Pinto, M. & Ruiz-Fons, F. European Rabbits as Reservoir for Coxiella burnetii. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1055–1058 (2015).
47. Seo, M.-G., Ouh, I.-O., Lee, S.-H. & Kwak, D. Detection and Genotyping of Coxiella burnetii in Pigs, South Korea, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 2192–2195 (2016).
48. Devaux, C. A., Osman, I. O., Million, M. & Raoult, D. Coxiella burnetii in Dromedary Camels (Camelus dromedarius): A Possible Threat for Humans and Livestock in North Africa and the Near and Middle East? *Front. Vet. Sci.* **7**, 558481 (2020).
49. Ferrara, G. *et al.* Serological Evidence of Q Fever among Dairy Cattle and Buffalo Populations in the Campania Region, Italy. *Pathogens* **11**, 901 (2022).
50. Reusken, C., Van Der Plaats, R., Opsteegh, M., De Bruin, A. & Swart, A. Coxiella burnetii (Q fever) in Rattus norvegicus and Rattus rattus at livestock farms and urban locations in the Netherlands; could Rattus spp. represent reservoirs for (re)introduction? *Prev. Vet. Med.* **101**, 124–130 (2011).
51. Bewley, K. R. Animal models of Q fever (Coxiella burnetii). *Comp. Med.* **63**, 469–476 (2013).

52. Keshavamurthy, R., Singh, B. B., Kalambe, D. G., Aulakh, R. S. & Dhand, N. K. Prevalence of *Coxiella burnetii* in cattle and buffalo populations in Punjab, India. *Prev. Vet. Med.* **166**, 16–20 (2019).
53. Caraguel, C., Bassett, S., González-Barrio, D., Elsworth, P. & Chaber, A.-L. Comparison of three serological tests for the detection of *Coxiella burnetii* specific antibodies in European wild rabbits. *BMC Vet. Res.* **16**, 315 (2020).
54. Klemmer, J. *et al.* Q fever in Egypt: Epidemiological survey of *Coxiella burnetii* specific antibodies in cattle, buffaloes, sheep, goats and camels. *PLOS ONE* **13**, e0192188 (2018).
55. Browne, A. S. *et al.* Serosurvey of *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dromedary Camels (*Camelus dromedarius*) in Laikipia County, Kenya. *Zoonoses Public Health* **64**, 543–549 (2017).
56. Janati Pirouz, H., Mohammadi, G., Mehrzad, J., Azizzadeh, M. & Nazem Shirazi, M. H. Seroepidemiology of Q fever in one-humped camel population in northeast Iran. *Trop. Anim. Health Prod.* **47**, 1293–1298 (2015).
57. DePuy, W. *et al.* Q Fever Risk Across a Dynamic, Heterogeneous Landscape in Laikipia County, Kenya. *EcoHealth* **11**, 429–433 (2014).
58. Hussein, M. F. *et al.* The Arabian camel (*Camelus dromedarius*) as a major reservoir of Q fever in Saudi Arabia. *Comp. Clin. Pathol.* **24**, 887–892 (2015).
59. Bolaños-Rivero, M., Carranza-Rodríguez, C., Rodríguez, N. F., Gutiérrez, C. & Pérez-Arellano, J.-L. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in Peridomestic and Wild Animals and Ticks in an Endemic Region (Canary Islands, Spain). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **17**, 630–634 (2017).
60. Körner, S., Makert, G. R., Ulbert, S., Pfeffer, M. & Mertens-Scholz, K. The Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hard Ticks in Europe and Their Role in Q Fever Transmission Revisited—A Systematic Review. *Front. Vet. Sci.* **8**, 655715 (2021).
61. Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S. & Jourdain, E. The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated? *Trends Parasitol.* **31**, 536–552 (2015).
62. Cooper, A., Hedlefs, R., Ketheesan, N. & Govan, B. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in dogs in a regional centre: SMALL ANIMALS. *Aust. Vet. J.* **89**, 385–387 (2011).
63. Anastácio, S. *et al.* *Coxiella burnetii* in Dogs and Cats from Portugal: Serological and Molecular Analysis. *Pathogens* **11**, 1525 (2022).
64. Ma, G. C. *et al.* New insights on the epidemiology of *Coxiella burnetii* in pet dogs and cats from New South Wales, Australia. *Acta Trop.* **205**, 105416 (2020).
65. Buhariwalla, F., Cann, B. & Marrie, T. J. A Dog-Related Outbreak of Q Fever. *Clin. Infect. Dis.* **23**, 753–755 (1996).
66. Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran *et al.* Are Dogs and Cats Possible Reservoirs for Human Q Fever in Iran? *Acta Vet. Eurasia* **47**, 37–43 (2021).
67. Komiya, T. *et al.* Seroprevalence of *Coxiella burnetii* Infections among Cats in Different Living Environments. *J. Vet. Med. Sci.* **65**, 1047–1048 (2003).

68. Webster, J. P., Lloyd, G. & Macdonald, D. W. Q fever (*Coxiella burnetii*) reservoir in wild brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in the UK. *Parasitology* **110** (Pt 1), 31–35 (1995).
69. Taylor, K. D. & Quay, R. J. Marking systems for the study of rat movements. *Mammal Rev.* **3**, 30–34 (1973).
70. Taylor, K. D. Range of Movement and Activity of Common Rats (*Rattus norvegicus*) on Agricultural Land. *J. Appl. Ecol.* **15**, 663 (1978).
71. Ebani, V. V. & Mancianti, F. Potential Role of Birds in the Epidemiology of *Coxiella burnetii*, *Coxiella*-like Agents and Hepatozoon spp. *Pathogens* **11**, 298 (2022).
72. Hirai, K. & To, H. Advances in the Understanding of *Coxiella burnetii* Infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **60**, 781–790 (1998).
73. Raska, K. & Syrucek, L. Q fever in domestic and wild birds. *Bull. World Health Organ.* **15**, 329–337 (1956).
74. Tissot-Dupont, H. & Raoult, D. Q Fever. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **22**, 505–514 (2008).
75. Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A. & Seegers, H. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Res.* **38**, 849–860 (2007).
76. Kersh, G. J. *et al.* Presence and Persistence of *Coxiella burnetii* in the Environments of Goat Farms Associated with a Q Fever Outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1697–1703 (2013).
77. Welsh, H. H., Lennette, E. H., Abinanti, F. R., Winn, J. F. & Kaplan, W. Q fever studies. XXI. The recovery of *Coxiella burnetii* from the soil and surface water of premises harboring infected sheep. *Am. J. Hyg.* **70**, 14–20 (1959).
78. ***Coxiella burnetii*** - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. *Transfus. Med. Hemotherapy* **41**, 60–72 (2014).
79. Rodolakis, A. *et al.* Comparison of *Coxiella burnetii* Shedding in Milk of Dairy Bovine, Caprine, and Ovine Herds. *J. Dairy Sci.* **90**, 5352–5360 (2007).
80. Bauer, B. *et al.* Comparison of *Coxiella burnetii* Excretion between Sheep and Goats Naturally Infected with One Cattle-Associated Genotype. *Pathogens* **9**, 652 (2020).
81. Angelakis, E. & Raoult, D. Emergence of q Fever. *Iran. J. Public Health* **40**, 1–18 (2011).
82. Cerf, O. & Condron, R. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiol. Infect.* **134**, 946–951 (2006).
83. Jodelko, A., Szymańska-Czerwińska, M., Kycko, A. & Niemczuk, K. Evaluation of the possibility of *C. burnetii* transmission by the alimentary route in a guinea pig model. *J. Vet. Res.* **63**, 311–315 (2019).
84. Krumbiegel, E. R. & Wisniewski, H. J. II. Consumption of Infected Raw Milk by Human Volunteers. *Arch. Environ. Health Int. J.* **21**, 63–65 (1970).
85. Miller, H. K., Priestley, R. A. & Kersh, G. J. Transmission of *Coxiella burnetii* by ingestion in mice. *Epidemiol. Infect.* **148**, e21 (2020).
86. Marmion, B. P. & Stoker, M. G. P. Epidemiology of Q Fever in Great Britain. *BMJ* **2**, 809–816 (1958).

87. Benson, W. W., Brock, D. W. & Mather, J. SEROLOGIC ANALYSIS OF A PENITENTIARY GROUP USING RAW MILK FROM A Q FEVER INFECTED HERD. *Public Health Rep. Wash. DC 1896* **78**, 707–710 (1963).
88. Rodolakis, A. Q Fever in Dairy Animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1166**, 90–93 (2009).
89. Rolain, J. M. *et al.* Concomitant or Consecutive Infection with *Coxiella burnetii* and Tickborne Diseases. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 82–88 (2005).
90. Beaman, M. H. & Hung, J. PERICARDITIS ASSOCIATED WITH TICK-BORNE Q FEVER. *Aust. N. Z. J. Med.* **19**, 254–256 (1989).
91. Borawski, K. *et al.* Assessment of *Coxiella burnetii* presence after tick bite in north-eastern Poland. *Infection* **48**, 85–90 (2020).
92. Parker, R. R., Bell, E. J. & Lackman, D. B. Experimental studies of Q fever in cattle; observations on four heifers and two milk cows. *Am. J. Hyg.* **48**, 191–206 (1948).
93. Kruszewska, D., Lembowicz, K. & Tylewska-Wierzbowska, S. Possible sexual transmission of Q fever among humans. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **22**, 1087–1088 (1996).
94. Miceli, M. H. *et al.* A case of person-to-person transmission of Q fever from an active duty serviceman to his spouse. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* **10**, 539–541 (2010).
95. Milazzo, A. *et al.* Sexually transmitted Q fever. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **33**, 399–402 (2001).
96. Kruszewska, D., Lembowicz, K. & Wierzbowska, S. T. Possible Sexual Transmission of Q Fever Among Humans. *Clin. Infect. Dis.* **22**, 1087–1088 (1996).
97. Kruszewska, D. & Tylewska-Wierzbowska, S. K. *Coxiella burnetii* penetration into the reproductive system of male mice, promoting sexual transmission of infection. *Infect. Immun.* **61**, 4188–4195 (1993).
98. Kruszewska, D. & Tylewska-Wierzbowska, S. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Res. Vet. Sci.* **62**, 299–300 (1997).
99. Amit, S., Shinar, S., Halutz, O., Atiya-Nasagi, Y. & Giladi, M. Suspected Person-to-Person Transmission of Q Fever Among Hospitalized Pregnant Women. *Clin. Infect. Dis.* **58**, e146–e147 (2014).
100. Weinstein, R. A., Weber, D. J. & Rutala, W. A. Risks and Prevention of Nosocomial Transmission of Rare Zoonotic Diseases. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 446–456 (2001).
101. Boden, K. *et al.* Maternofetal consequences of *Coxiella burnetii* infection in pregnancy: a case series of two outbreaks. *BMC Infect. Dis.* **12**, 359 (2012).
102. Raoult, D. & Stein, A. Q Fever during Pregnancy -- A Risk for Women, Fetuses, and Obstetricians. *N. Engl. J. Med.* **330**, 371–371 (1994).
103. Harman, J. B. Q FEVER IN GREAT BRITAIN CLINICAL ACCOUNT OF EIGHT CASES. *The Lancet* **254**, 1028–1030 (1949).
104. Dorko, E., Rimárová, K. & Pilipčinec, E. Influence of the Environment and Occupational Exposure on the Occurrence of Q Fever. *Cent. Eur. J. Public Health* **20**, 208–214 (2012).

105. Groten, T. *et al.* Who is at risk of occupational Q fever: new insights from a multi-profession cross-sectional study. *BMJ Open* **10**, e030088 (2020).
106. Garner, M. G., Longbottom, H. M., Cannon, R. M. & Plant, A. J. A review of Q fever in Australia 1991-1994. *Aust. N. Z. J. Public Health* **21**, 722–730 (1997).
107. Tan, T. S. *et al.* Identifying scenarios and risk factors for Q fever outbreaks using qualitative analysis of expert opinion. *Zoonoses Public Health* **69**, 344–358 (2022).
108. Schimmer, B. *et al.* *Coxiella burnetii* Seroprevalence and Risk for Humans on Dairy Cattle Farms, the Netherlands, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, (2014).
109. Vellema, P. & Van Den Brom, R. The rise and control of the 2007–2012 human Q fever outbreaks in the Netherlands. *Small Rumin. Res.* **118**, 69–78 (2014).
110. Pexara, A., Solomakos, N. & Govaris, A. Q fever and prevalence of *Coxiella burnetii* in milk. *Trends Food Sci. Technol.* **71**, 65–72 (2018).
111. Leone, M. *et al.* Effect of Sex on *Coxiella burnetii* Infection: Protective Role of 17 β -Estradiol. *J. Infect. Dis.* **189**, 339–345 (2004).
112. Gale, P., Kelly, L., Mearns, R., Duggan, J. & Snary, E. L. Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products - a risk profile and exposure assessment. *J. Appl. Microbiol.* **118**, 1083–1095 (2015).
113. Raoult, D. *et al.* Q fever and HIV infection: *AIDS* **7**, 81–86 (1993).
114. Ghanem-Zoubi, N. & Paul, M. Q fever during pregnancy: a narrative review. *Clin. Microbiol. Infect.* **26**, 864–870 (2020).
115. Hatchette, T. F. *et al.* Goat-Associated Q Fever: A New Disease in Newfoundland. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 413–419 (2001).
116. Karagiannis, I. *et al.* Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* **137**, 1283–1294 (2009).
117. McCAUGHEY, C. *et al.* *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiol. Infect.* **138**, 21–27 (2010).
118. Paul, S., Agger, J. F., Markussen, B., Christoffersen, A.-B. & Agerholm, J. S. Factors associated with *Coxiella burnetii* antibody positivity in Danish dairy cows. *Prev. Vet. Med.* **107**, 57–64 (2012).
119. Agger, J. F. & Paul, S. Increasing prevalence of *Coxiella burnetii* seropositive Danish dairy cattle herds. *Acta Vet. Scand.* **56**, 46 (2014).
120. Nusinovici, S. *et al.* Relative contributions of neighbourhood and animal movements to *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle herds. *Geospatial Health* **8**, 471 (2014).
121. Clark, N. J. & Soares Magalhães, R. J. Airborne geographical dispersal of Q fever from livestock holdings to human communities: a systematic review and critical appraisal of evidence. *BMC Infect. Dis.* **18**, 218 (2018).
122. Schimmer, B. *et al.* The use of a geographic information system to identify a dairy goat farm as the most likely source of an urban Q-fever outbreak. *BMC Infect. Dis.* **10**, 69 (2010).
123. Carrieri, M. *et al.* Investigation of a Slaughterhouse-Related Outbreak of Q Fever in the French Alps. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**, 17–21 (2002).

124. Hermans, T., Jeurissen, L., Hackert, V. & Hoebe, C. Land-Applied Goat Manure as a Source of Human Q-Fever in the Netherlands, 2006–2010. *PLoS ONE* **9**, e96607 (2014).
125. Nusinovici, S., Frössling, J., Widgren, S., Beaudeau, F. & Lindberg, A. Q fever infection in dairy cattle herds: increased risk with high wind speed and low precipitation. *Epidemiol. Infect.* **143**, 3316–3326 (2015).
126. Frössling, J., Ohlson, A., Björkman, C., Håkansson, N. & Nöremark, M. Application of network analysis parameters in risk-based surveillance – Examples based on cattle trade data and bovine infections in Sweden. *Prev. Vet. Med.* **105**, 202–208 (2012).
127. Nöremark, M., Håkansson, N., Lewerin, S. S., Lindberg, A. & Jonsson, A. Network analysis of cattle and pig movements in Sweden: Measures relevant for disease control and risk based surveillance. *Prev. Vet. Med.* **99**, 78–90 (2011).
128. Christley, R. M. *et al.* Infection in Social Networks: Using Network Analysis to Identify High-Risk Individuals. *Am. J. Epidemiol.* **162**, 1024–1031 (2005).
129. European Centre for Disease Prevention and Control. *Annual Epidemiological Report for 2019 - Q Fever*. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-Q-fever-2019.pdf> (2021).
130. INE. Casos notificados de doenças de declaração obrigatória (Série 2009-2014 - N.º e Série 2015 - N.º) por Local de residência (NUTS - 2013), Sexo e Doenças de declaração obrigatória; Anual - DGS, Casos Notificados de Doenças de Declaração Obrigatória. https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0008458&selTab=tab0&xlang=pt.
131. Portal da Transparência, SNS. Doenças de notificação obrigatória: nº casos de febre Q, 2018, Portugal. https://transparencia.sns.gov.pt/explore/dataset/doencas-de-declaracao-obrigatoria/table/?flg=pt-pt&disjunctive.regiao_de_saude_de_notificacao&disjunctive.residencia_nut_iii&disjunctive.doenca_de_declaracao_obrigatoria&disjunctive.sexo&disjunctive.grupo_etario&sort=-regiao_de_saude_de_notificacao&q=febre+q&refine.tempo=2018.
132. Direção-Geral da Saúde. Arquivo do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (V1.0) - obtidos apenas dados agregados, com a confidencialidade dos dados garantida, sem mais questões éticas a ter em consideração. <https://sinave.min-saude.pt/SINAVE.MIN-SAUDE/login.html>.
133. Gidding, H. F. *et al.* Q fever seroprevalence in Australia suggests one in twenty people have been exposed. *Epidemiol. Infect.* **148**, e18 (2020).
134. El-Mahallawy, H. S. *et al.* Q fever in China: a systematic review, 1989–2013. *Epidemiol. Infect.* **143**, 673–681 (2015).
135. Nicholson, W. L. *et al.* Seroprevalence of Q Fever in the United States, 2003–2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **81**, 691–694 (2009).
136. Sahu, R. *et al.* Current perspectives on the occurrence of Q fever: highlighting the need for systematic surveillance for a neglected zoonotic disease in Indian subcontinent. *Environ. Microbiol. Rep.* **13**, 138–158 (2021).

137. Christodoulou, M., Malli, F., Tsaras, K., Billinis, C. & Papagiannis, D. A Narrative Review of Q Fever in Europe. *Cureus* (2023) doi:10.7759/cureus.38031.
138. Bwatota, S. F. *et al.* Epidemiology of Q-fever in domestic ruminants and humans in Africa. A systematic review. *CABI One Health* **2022**, cabionehealth.2022.0008 (2022).
139. Muema, J. *et al.* Endemicity of *Coxiella burnetii* infection among people and their livestock in pastoral communities in northern Kenya. *Heliyon* **8**, e11133 (2022).
140. Cruz, R. *et al.* Occupationally Acquired Q Fever in Shepherds and Sheep Milk Cheesemakers. *EcoHealth* **17**, 255–257 (2020).
141. Bailly, S. *et al.* Transmission dynamics of Q fever in French Guiana: A population-based cross-sectional study. *Lancet Reg. Health - Am.* **16**, 100385 (2022).
142. González-Quijada, S., Salazar-Thieroldt, E. & Mora-Simón, M. J. Persistent Q fever and ischaemic stroke in elderly patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 362–367 (2015).
143. Jaubert, J. *et al.* Seroprevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) Exposure in Humans on Reunion Island. *Open Forum Infect. Dis.* **6**, ofz227 (2019).
144. Schimmer, B. *et al.* Low seroprevalence of Q fever in The Netherlands prior to a series of large outbreaks. *Epidemiol. Infect.* **140**, 27–35 (2012).
145. McCaughey, C. *et al.* Human Seroprevalence to *Coxiella burnetii* (Q fever) in Northern Ireland. *Zoonoses Public Health* **55**, 189–194 (2008).
146. Guatteo, R., Seegers, H., Tarel, A.-F., Joly, A. & Beaudeau, F. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. *Vet. Microbiol.* **149**, 1–16 (2011).
147. Meadows, S., Jones-Bitton, A., McEwen, S., Jansen, J. & Menzies, P. *Coxiella burnetii* seropositivity and associated risk factors in sheep in Ontario, Canada. *Prev. Vet. Med.* **122**, 129–134 (2015).
148. Sondgeroth, K. S. *et al.* Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in Washington State Domestic Goat Herds. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **13**, 779–783 (2013).
149. De Oliveira, J. M. B. *et al.* *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. *Acta Trop.* **183**, 19–22 (2018).
150. Li, K., Luo, H. & Shahzad, M. Epidemiology of Q-fever in goats in Hubei province of China. *Trop. Anim. Health Prod.* **50**, 1395–1398 (2018).
151. Dhaka, P. *et al.* Seroprevalence and molecular detection of coxiellosis among cattle and their human contacts in an organized dairy farm. *J. Infect. Public Health* **12**, 190–194 (2019).
152. Hou, K. *et al.* A cross-sectional survey of risk factors for the presence of *Coxiella burnetii* in Australian commercial dairy goat farms. *Aust. Vet. J.* **100**, 296–305 (2022).
153. Scolamacchia, F. *et al.* Serological Patterns of Brucellosis, Leptospirosis and Q Fever in *Bos indicus* Cattle in Cameroon. *PLoS ONE* **5**, e8623 (2010).
154. Troupin, C. *et al.* Seroprevalence of brucellosis, Q fever and Rift Valley fever in domestic ruminants in Guinea in 2017–2019. *BMC Vet. Res.* **18**, 64 (2022).
155. Sadiki, V., Gcebe, N., Mangena, M. L., Ngoshe, Y. B. & Adesiyun, A. A. Prevalence and risk factors of Q fever (*Coxiella burnetii*) in cattle on farms of Limpopo province, South Africa. *Front. Vet. Sci.* **10**, 1101988 (2023).

156. Q fever and seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants. *Vet. Ital.* 265–279 (2018) doi:10.12834/VetIt.1113.6046.3.
157. Gache, K. *et al.* Estimation of the frequency of Q fever in sheep, goat and cattle herds in France: results of a 3-year study of the seroprevalence of Q fever and excretion level of *Coxiella burnetii* in abortive episodes. *Epidemiol. Infect.* **145**, 3131–3142 (2017).
158. Espí, A. *et al.* One Health Approach: An Overview of Q Fever in Livestock, Wildlife and Humans in Asturias (Northwestern Spain). *Animals* **11**, 1395 (2021).
159. Vourvidis, D., Kyrma, A., Linou, M., Edouard, S. & Angelakis, E. Sero-epidemiology investigation of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants throughout most Greek regions. *Vet. Med. Sci.* **7**, 99–104 (2021).
160. Czaplicki, G. *et al.* Apparent prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* (Q fever) in bulk tank milk from dairy herds in southern Belgium. *Vet. J.* **192**, 529–531 (2012).
161. Astobiza, I. *et al.* Estimation of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy cattle in intensive systems by serological and molecular analyses of bulk-tank milk samples. *J. Dairy Sci.* **95**, 1632–1638 (2012).
162. Vicari, N. *et al.* Occurrence of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk from northwestern Italy. *Vet. Rec.* **172**, 687–687 (2013).
163. Fanelli, A., Trotta, A., Bono, F., Corrente, M. & Buonavoglia, D. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in dairy cattle and buffalo from Southern Italy: *C. burnetii* in Southern Italy. *Vet. Ital.* **56**, 193–197 (2020).
164. Boroduske, A. *et al.* *Coxiella burnetii* (Q fever) infection in dairy cattle and associated risk factors in Latvia. *Epidemiol. Infect.* **145**, 2011–2019 (2017).
165. Muskens, J., Van Engelen, E., Van Maanen, C., Bartels, C. & Lam, T. J. G. M. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. *Vet. Rec.* **168**, 79–79 (2011).
166. Van Den Brom, R., Moll, L., Van Schaik, G. & Vellema, P. Demography of Q fever seroprevalence in sheep and goats in The Netherlands in 2008. *Prev. Vet. Med.* **109**, 76–82 (2013).
167. Van Engelen, E. *et al.* Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing. *Prev. Vet. Med.* **117**, 103–109 (2014).
168. Velasova, M. *et al.* Herd-level prevalence of selected endemic infectious diseases of dairy cows in Great Britain. *J. Dairy Sci.* **100**, 9215–9233 (2017).
169. Ryan, E., Kirby, M., Clegg, T. & Collins, D. M. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in sheep and goats in the Republic of Ireland. *Vet. Rec.* **169**, 280–280 (2011).
170. Anastácio, S., Carolino, N., Sidi-Boumedine, K. & Da Silva, G. J. Q Fever Dairy Herd Status Determination Based on Serological and Molecular Analysis of Bulk Tank Milk. *Transbound. Emerg. Dis.* **63**, e293–e300 (2016).
171. Anastácio, S., Tavares, N., Carolino, N., Sidi-Boumedine, K. & Da Silva, G. J. Serological evidence of exposure to *Coxiella burnetii* in sheep and goats in central Portugal. *Vet. Microbiol.* **167**, 500–505 (2013).

172. Pimenta, L. *et al.* Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Portuguese dairy cattle herds. *Trop. Anim. Health Prod.* **47**, 227–230 (2015).
173. Cruz, R. *et al.* Outbreaks of abortions by *Coxiella burnetii* in small ruminant flocks and a longitudinal serological approach on archived bulk tank milk suggest Q fever emergence in Central Portugal. *Transbound. Emerg. Dis.* **65**, 972–975 (2018).
174. Cruz, R. *et al.* Prospective Serosurvey of *Coxiella burnetii* Antibodies in Selected Sheep of Portugal. *EcoHealth* **15**, 871–874 (2018).
175. Rodrigues, R. E. Prevalência e fatores de risco para a presença de *Coxiella burnetii* em explorações leiteiras da Ilha Terceira. (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2019).
176. Cruz, R. *et al.* A Nationwide Seroepidemiologic Study on Q Fever Antibodies in Sheep of Portugal. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **18**, 601–604 (2018).
177. Nelson Eduardo de Castro Maia. Febre Q em bovinos de leite: Análise da situação em 5 explorações do Concelho de Barcelos. (Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2016).
178. Maria Teresa Pinto de Carvalho Leitão. Prevalência da Febre Q em leite de tanque de vacarias do Centro Litoral de Portugal. (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2023).
179. Coelho, P., Silveira, E., Da Silva, G. & Anastacio, S. Coxiellosis in dairy cattle herds: serological and molecular study. *Int. J. Infect. Dis.* **116**, S66 (2022).
180. Maltezou, H. C. & Raoult, D. Q fever in children. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 686–691 (2002).
181. Todkill, D., Fowler, T. & Hawker, J. I. Estimating the incubation period of acute Q fever, a systematic review. *Epidemiol. Infect.* **146**, 665–672 (2018).
182. Ullah, Q., Jamil, T., Saqib, M., Iqbal, M. & Neubauer, H. Q Fever—A Neglected Zoonosis. *Microorganisms* **10**, 1530 (2022).
183. Million, M. & Raoult, D. No Such Thing as Chronic Q Fever. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, (2017).
184. Raoult, D. Chronic Q fever: Expert opinion versus literature analysis and consensus. *J. Infect.* **65**, 102–108 (2012).
185. Million, M. & Raoult, D. Recent advances in the study of Q fever epidemiology, diagnosis and management. *J. Infect.* **71**, S2–S9 (2015).
186. Raoult, D. Q Fever: Confusion Between Chronic Infection and Chronic Fatigue. *Clin. Infect. Dis.* **65**, 1054–1055 (2017).
187. Lin, P.-H. *et al.* Acute Q Fever Presenting as Fever of Unknown Origin with Rapidly Progressive Hepatic Failure in a Patient with Alcoholism. *J. Formos. Med. Assoc.* **107**, 896–901 (2008).
188. Lee, M. *et al.* Clinicopathologic Features of Q Fever Patients with Acute Hepatitis. *Korean J. Pathol.* **46**, 10 (2012).
189. Dauby, N., Gomez Galdon, M., Montesinos, I., Van Esbroeck, M. & Sersté, T. Q-fever associated granulomatous hepatitis. *Int. J. Infect. Dis.* **95**, 113–114 (2020).

190. Lucia, Z. *et al.* A case of coexistent acute severe alcoholic and Q fever hepatitis: The useful contribution of repeated liver biopsies. *Ann. Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **6**, 034–038 (2022).
191. Lai, C.-H. *et al.* Acute Q Fever Hepatitis in Patients with and without Underlying Hepatitis B or C Virus Infection. *Clin. Infect. Dis.* **45**, e52–e59 (2007).
192. Fournier, P.-E., Etienne, J., Harle, J.-R., Habib, G. & Raoult, D. Myocarditis, a Rare but Severe Manifestation of Q Fever: Report of 8 Cases and Review of the Literature. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 1440–1447 (2001).
193. Jacobson, A. & Sutthiwan, P. Myocarditis: A rare manifestation of acute Q fever infection. *J. Cardiol. Cases* **20**, 45–48 (2019).
194. Carrascosa, M. F. *et al.* Acute Q fever myocarditis: Thinking about a life-threatening but potentially curable condition. *Int. J. Cardiol.* **158**, e17–e19 (2012).
195. Vogiatzis, I., Dimoglou, G. & Sachpekidis, V. Q fever myocarditis. *Hippokratia* **12**, 46–49 (2008).
196. Raoult, D. *et al.* Q Fever 1985-1998: Clinical and Epidemiologic Features of 1,383 Infections: *Medicine (Baltimore)* **79**, 109–123 (2000).
197. Levy, P., Carrieri, P. & Raoult, D. Coxiella burnetii Pericarditis: Report of 15 Cases and Review. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 393–397 (1999).
198. Levy, P. Y. *et al.* Diagnosis of *Coxiella burnetii* Pericarditis Using a Systematic Prescription Kit in Case of Pericardial Effusion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1078**, 248–251 (2006).
199. Terheggen, U. & Leggat, P. A. Clinical manifestations of Q fever in adults and children. *Travel Med. Infect. Dis.* **5**, 159–164 (2007).
200. Uribe Pulido, N., Escorcia García, C., Cabrera Orrego, R., Gutiérrez, L. A. & Agudelo, C. A. Acute Q Fever With Dermatologic Manifestations, Molecular Diagnosis, and No Seroconversion. *Open Forum Infect. Dis.* **8**, ofab458 (2021).
201. Vanden Bussche, S. *et al.* A case of Q fever with hepatitis and an atypical skin lesion. *Acta Gastro-Enterol. Belg.* **81**, 441–442 (2018).
202. Meriglier, E., Asquier, L., Roblot, F., Roblot, P. & Landron, C. A case of Q fever with erythema nodosum. *Infection* **46**, 127–129 (2018).
203. Soulard, R. *et al.* Histopathology of a granulomatous lobular panniculitis in acute Q fever: a case report. *J. Cutan. Pathol.* **37**, 870–876 (2010).
204. Kofteridis, D. P., Mazokopakis, E. E., Tselentis, Y. & Gikas, A. Neurological complications of acute Q fever infection. *Eur. J. Epidemiol.* **19**, 1051–1054 (2004).
205. Skiba, V. & Barner, K. C. Central Nervous System Manifestations of Q Fever Responsive to Steroids. *Mil. Med.* **174**, 857–859 (2009).
206. Bernit, E. *et al.* Neurological Involvement in Acute Q Fever: A Report of 29 Cases and Review of the Literature. *Arch. Intern. Med.* **162**, 693 (2002).
207. Choi, H. C. *et al.* A Case of Acute Q Fever with Severe Acute Cholestatic Hepatitis. *Gut Liver* **3**, 141–144 (2009).

208. Morroy, G. *et al.* Fatigue following Acute Q-Fever: A Systematic Literature Review. *PLOS ONE* **11**, e0155884 (2016).
209. Million, M., Thuny, F., Richet, H. & Raoult, D. Long-term outcome of Q fever endocarditis: a 26-year personal survey. *Lancet Infect. Dis.* **10**, 527–535 (2010).
210. Million, M., Walter, G., Thuny, F., Habib, G. & Raoult, D. Evolution From Acute Q Fever to Endocarditis Is Associated With Underlying Valvulopathy and Age and Can Be Prevented by Prolonged Antibiotic Treatment. *Clin. Infect. Dis.* **57**, 836–844 (2013).
211. Botelho-Nevers, E. *et al.* *Coxiella burnetii* infection of aortic aneurysms or vascular grafts: report of 30 new cases and evaluation of outcome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**, 635–640 (2007).
212. Mejia, A., Toursarkissian, B., Hagino, R. T., Myers, J. G. & Sykes, M. T. Primary Aortoduodenal Fistula and Q Fever: An Underrecognized Association? *Ann. Vasc. Surg.* **14**, 271–273 (2000).
213. Wegdam-Blans, M. C. A. *et al.* Vascular Complications of Q-fever Infections. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **42**, 384–392 (2011).
214. Francis, J. R. *et al.* Chronic Recurrent Multifocal Q Fever Osteomyelitis in Children: An Emerging Clinical Challenge. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **35**, 972–976 (2016).
215. Yebra, M., Marazuela, M., Albarran, F. & Moreno, A. Chronic Q Fever Hepatitis. *Clin. Infect. Dis.* **10**, 1229–1230 (1988).
216. Kelm, D. J. *et al.* Pulmonary manifestations of Q fever: analysis of 38 patients. *J. Thorac. Dis.* **9**, 3973–3978 (2017).
217. Perez-Fontan, M. *et al.* Glomerular Nephropathy Associated With Chronic Q Fever. *Am. J. Kidney Dis.* **11**, 298–306 (1988).
218. Melenotte, C. *et al.* Clinical Features and Complications of *Coxiella burnetii* Infections From the French National Reference Center for Q Fever. *JAMA Netw. Open* **1**, e181580 (2018).
219. Strauss, B., Löschau, M., Seidel, T., Stallmach, A. & Thomas, A. Are fatigue symptoms and chronic fatigue syndrome following Q fever infection related to psychosocial variables? *J. Psychosom. Res.* **72**, 300–304 (2012).
220. Rajmakers, R. P. H. *et al.* Multi-omics examination of Q fever fatigue syndrome identifies similarities with chronic fatigue syndrome. *J. Transl. Med.* **18**, 448 (2020).
221. Marmion, B. P. *et al.* Q fever: persistence of antigenic non-viable cell residues of *Coxiella burnetii* in the host—implications for post Q fever infection fatigue syndrome and other chronic sequelae. *QJM* **102**, 673–684 (2009).
222. Raoult, D., Fenollar, F. & Stein, A. Q Fever During Pregnancy: Diagnosis, Treatment, and Follow-up. *Arch. Intern. Med.* **162**, 701 (2002).
223. Tissot-Dupont, H., Vaillant, V., Rey, S. & Raoult, D. Role of Sex, Age, Previous Valve Lesion, and Pregnancy in the Clinical Expression and Outcome of Q Fever after a Large Outbreak. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 232–237 (2007).
224. Marks, S. & Olenski, M. Q Fever in the First Trimester: A Case Report from Northern Rural New South Wales. *Trop. Med. Infect. Dis.* **4**, 90 (2019).

225. Jaubert, J. *et al.* Q fever seroprevalence in parturient women: the EQRUN cross-sectional study on Reunion Island. *BMC Infect. Dis.* **20**, 261 (2020).
226. Guatteo, R., Joly, A. & Beaudeau, F. Shedding and serological patterns of dairy cows following abortions associated with *Coxiella burnetii* DNA detection. *Vet. Microbiol.* **155**, 430–433 (2012).
227. Lang, G. H. Serosurvey of *Coxiella burnetii* infection in dairy goat herds in Ontario. A comparison of two methods of enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire* **52**, 37–41 (1988).
228. Agerholm, J. S. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals—a critical review. *Acta Vet. Scand.* **55**, 13 (2013).
229. Palmer, N. C. *et al.* Placentitis and Abortion in Goats and Sheep in Ontario Caused by *Coxiella burnetii*. *Can. Vet. J. Rev. Veterinaire Can.* **24**, 60–61 (1983).
230. Cantas, H., Muwonge, A., Sareyyupoglu, B., Yardimci, H. & Skjerve, E. Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus. *BMC Vet. Res.* **7**, 13 (2011).
231. Jensen, T. K. *et al.* Application of fluorescent *in situ* hybridisation for demonstration of *Coxiella burnetii* in placentas from ruminant abortions. *APMIS* **115**, 347–353 (2007).
232. the working group “Applied Microbiology” of the School of Biological Sciences and Engineering at Yachay Tech University *et al.* Serology for Neosporosis, Q fever and Brucellosis to assess the cause of abortion in two dairy cattle herds in Ecuador. *BMC Vet. Res.* **15**, 194 (2019).
233. Bildfell, R. J., Thomson, G. W., Haines, D. M., McEwen, B. J. & Smart, N. *Coxiella Burnetii* Infection is Associated with Placentitis in Cases of Bovine Abortion. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**, 419–425 (2000).
234. Cutler, S. J., Bouzid, M. & Cutler, R. R. Q fever. *J. Infect.* **54**, 313–318 (2007).
235. Barlow, J. *et al.* Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. *Vet. Res.* **39**, 23 (2008).
236. To, H. *et al.* Prevalence of *Coxiella burnetii* Infection in Dairy Cattle with Reproductive Disorders. *J. Vet. Med. Sci.* **60**, 859–861 (1998).
237. Macías-Rioseco, M. *et al.* Bovine abortion caused by *Coxiella burnetii*: report of a cluster of cases in Uruguay and review of the literature. *J. Vet. Diagn. Invest.* **31**, 634–639 (2019).
238. De Biase, D. *et al.* *Coxiella burnetii* in Infertile Dairy Cattle With Chronic Endometritis. *Vet. Pathol.* **55**, 539–542 (2018).
239. Sánchez, J. *et al.* Experimental *Coxiella burnetii* Infection in Pregnant Goats: a Histopathological and Immunohistochemical Study. *J. Comp. Pathol.* **135**, 108–115 (2006).
240. Bouvery, N. A., Souriau, A., Lechopier, P. & Rodolakis, A. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet. Res.* **34**, 423–433 (2003).
241. Arricau-Bouvery, N. *et al.* Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* **23**, 4392–4402 (2005).
242. Martinov, S. P., Neikov, P. & Popov, G. V. Experimental Q fever in sheep. *Eur. J. Epidemiol.* **5**, 428–431 (1989).

243. Brooks, D. L. *et al.* Q fever vaccination of sheep: challenge of immunity in ewes. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 1235–1238 (1986).
244. Tagesu, T. Q Fever in Small Ruminants and its Public Health Importance. *J. Dairy Vet. Sci.* **9**, (2019).
245. Anastácio, S., De Sousa, S. R., Saavedra, M. J. & Da Silva, G. J. Role of Goats in the Epidemiology of *Coxiella burnetii*. *Biology* **11**, 1703 (2022).
246. Robi, D. T., Demissie, W. & Temteme, S. Coxiellosis in Livestock: Epidemiology, Public Health Significance, and Prevalence of *Coxiella burnetii* Infection in Ethiopia. *Vet. Med. Res. Rep.* **Volume 14**, 145–158 (2023).
247. Yohannes, G. Review on Q fever in Small Ruminants and its Public Health Importance. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* **9**, (2018).
248. Cabell, E. Bovine abortion: aetiology and investigations. *In Pract.* **29**, 455–463 (2007).
249. Neupane, K. & Kaswan, D. *Coxiella burnetii* Infection. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023).
250. Daniel Givens, M. & Marley, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology* **70**, 270–285 (2008).
251. Godin, A.-C. *et al.* Investigation of *Chlamydomphila* spp. in dairy cows with reproductive disorders. *Acta Vet. Scand.* **50**, 39 (2008).
252. Lanyon, S. R., Hill, F. I., Reichel, M. P. & Brownlie, J. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Vet. J.* **199**, 201–209 (2014).
253. Mangena, M. L., Gcebe, N., Thompson, P. N. & Adesiyun, A. A. Q fever and toxoplasmosis in South African livestock and wildlife: a retrospective study on seropositivity, sporadic abortion, and stillbirth cases in livestock caused by *Coxiella burnetii*. *BMC Vet. Res.* **19**, 168 (2023).
254. Taurel, A.-F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H. & Beaudeau, F. Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds. *Prev. Vet. Med.* **101**, 51–57 (2011).
255. Plummer, P. J. *et al.* Management of *C. oxiiella burnetii* infection in livestock populations and the associated zoonotic risk: A consensus statement. *J. Vet. Intern. Med.* **32**, 1481–1494 (2018).
256. Roest, H. I. J., Bossers, A. & Rebel, J. M. J. Q Fever Diagnosis and Control in Domestic Ruminants. in *Developments in Biologicals* (eds. Roth, J. A., Richt, J. A. & Morozov, I. A.) vol. 135 183–189 (S. KARGER AG, Basel, 2013).
257. Horigan, M. W., Bell, M. M., Pollard, T. R., Sayers, A. R. & Pritchard, G. C. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Vet. Diagn. Invest.* **23**, 924–931 (2011).
258. Frangoulidis, D. *et al.* DNA microarray-chip based diagnosis of Q-fever (*Coxiella burnetii*). *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 165–166 (2009).
259. Fournier, P.-E. & Raoult, D. Comparison of PCR and Serology Assays for Early Diagnosis of Acute Q Fever. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5094–5098 (2003).

260. Vincent, G. A. *et al.* Isolation of *Coxiella burnetii* from serum of patients with acute Q fever. *J. Microbiol. Methods* **119**, 74–78 (2015).
261. Raoult, D., Laurent, J. C. & Mutilod, M. Monoclonal Antibodies to *Coxiella burnetii* for Antigenic Detection in Cell Cultures and in Paraffin-embedded Tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* **101**, 318–320 (1994).
262. Fournier, P.-E., Marrie, T. J. & Raoult, D. Diagnosis of Q Fever. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1823–1834 (1998).
263. Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A. & Seegers, H. Assessing the Within-herd Prevalence of *Coxiella burnetii* Milk-shedder Cows using a Real-time PCR Applied to Bulk Tank Milk. *Zoonoses Public Health* **54**, 191–194 (2007).
264. Rousset, E. *et al.* Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet. Microbiol.* **124**, 286–297 (2007).
265. Koka, H., Sang, R., Kutima, H. L. & Musila, L. *Coxiella burnetii* Detected in Tick Samples from Pastoral Communities in Kenya. *BioMed Res. Int.* **2018**, 1–5 (2018).
266. Taurel, A.-F., Guatteo, R., Lehebel, A., Joly, A. & Beaudeau, F. Vaccination using phase I vaccine is effective to control *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy cattle herds. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 1–9 (2014).
267. Taurel, A.-F., Guatteo, R., Joly, A. & Beaudeau, F. Effectiveness of vaccination and antibiotics to control *Coxiella burnetii* shedding around calving in dairy cows. *Vet. Microbiol.* **159**, 432–437 (2012).
268. Washburn, K. *et al.* Pharmacokinetics of chlortetracycline in maternal plasma and in fetal tissues following oral administration to pregnant ewes. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **41**, 218–223 (2018).
269. Washburn, K. *et al.* Pharmacokinetics of oral chlortetracycline in nonpregnant adult ewes. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **37**, 607–610 (2014).
270. Berri, M., Souriau, A., Crosby, M. & Rodolakis, A. Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Vet. Microbiol.* **85**, 55–60 (2002).
271. Kersh, G. J. Antimicrobial therapies for Q fever. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **11**, 1207–1214 (2013).
272. Bauer, B. U. *et al.* Humoral and cellular immune responses in sheep following administration of different doses of an inactivated phase I vaccine against *Coxiella burnetii*. *Vaccine* **41**, 4798–4807 (2023).
273. Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A. & Beaudeau, F. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* **26**, 4320–4328 (2008).
274. Williams-Macdonald, S. E. *et al.* Efficacy of Phase I and Phase II *Coxiella burnetii* Bacterin Vaccines in a Pregnant Ewe Challenge Model. *Vaccines* **11**, 511 (2023).
275. Tomaiuolo, S. *et al.* QuilA® adjuvanted Coxevac® sustains Th1-CD8+-type immunity and increases protection in *Coxiella burnetii*-challenged goats. *Npj Vaccines* **8**, 17 (2023).

276. Redden, P. *et al.* Q fever – immune responses and novel vaccine strategies. *Future Microbiol.* fmb-2023-0117 (2023) doi:10.2217/fmb-2023-0117.
277. Woldeyohannes, S. M. *et al.* Q fever vaccine efficacy and occupational exposure risk in Queensland, Australia: A retrospective cohort study. *Vaccine* **38**, 6578–6584 (2020).
278. Câmara Municipal de Vila do Conde & INE. Principais Indicadores Sociodemográficos da Freguesia em 2011. https://www.cm-viladoconde.pt/cmviladoconde/uploads/writer_file/document/698/20140114165941672795.pdf (2011).
279. Taurel, A.-F., Guatteo, R., Joly, A. & Beaudeau, F. Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows. *Epidemiol. Infect.* **140**, 1710–1713 (2012).
280. Ruiz-Fons, F. *et al.* Measuring antibody levels in bulk-tank milk as an epidemiological tool to search for the status of *Coxiella burnetii* in dairy sheep. *Epidemiol. Infect.* **139**, 1631–1636 (2011).
281. Guatteo, R. *et al.* Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet. Res.* **37**, 827–833 (2006).
282. Nogareda, C., Almería, S., Serrano, B., García-Ispuerto, I. & López-Gatius, F. Dynamics of *Coxiella burnetii* antibodies and seroconversion in a dairy cow herd with endemic infection and excreting high numbers of the bacterium in the bulk tank milk. *Res. Vet. Sci.* **93**, 1211–1212 (2012).
283. Nusinovici, S., Madouasse, A., Hoch, T., Guatteo, R. & Beaudeau, F. Evaluation of Two PCR Tests for *Coxiella burnetii* Detection in Dairy Cattle Farms Using Latent Class Analysis. *PLOS ONE* **10**, e0144608 (2015).